



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0119143
(43) 공개일자 2022년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7025531
(22) 출원일자(국제) 2020년12월23일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년07월21일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/138591
(87) 국제공개번호 WO 2021/129656
국제공개일자 2021년07월01일

(30) 우선권주장
PCT/CN2019/127903 2019년12월24일 중국(CN)

(71) 출원인
디잘 (지양수) 파마슈티칼 씨오., 리미티드
중국 지양수 프로빈스 우시 신우 디스트릭트 이스
트 징후이 로드 빌딩 이 (빌딩 엔오.5) 오브 후이
룽 플라자, 스위트 4105

(72) 발명자
왕 메이
중국 201203 상하이 장지양 하이-테크 파크 리양
징 로드 넘버 199
구오 키우리
중국 201203 상하이 장지양 하이-테크 파크 리양
징 로드 넘버 199
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 항FGFR2B 항체**

(57) 요약

항FGFR2b 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 그를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 그를 포함하는 약학 조성물, 및 그의 용도를 제공한다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2333/71 (2013.01)

(72) 발명자

바이 유

중국 201203 상하이 장지양 하이-테크 파크 리양징
로드 넘버 199

양 전판

중국 201203 상하이 장지양 하이-테크 파크 리양징
로드 넘버 199

장 샤오린

중국 201203 상하이 장지양 하이-테크 파크 리양징
로드 넘버 199

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 1, 3, 및 5로 구성된 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 서열; 및/또는 서열 번호 2, 4 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 단리된 항체로서, 항체는 FGFR2b 및 FGFR1b 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, FGFR2c에 대한 검출가능한 결합 친화성을 갖지 않는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 번호 5의 중쇄 CDR3, 및/또는 서열 번호 6의 경쇄 CDR3을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열 번호 1, 3, 및 5를 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H), 및/또는 서열 번호 2, 4 및 6을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 7, 또는 서열 번호 7과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 9, 또는 서열 번호 9와 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하되, FGFR2b에 대한 및/또는 FGFR1b에 대한 특이적인 결합 친화성은 보유하는 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나가 CDR 서열 중 하나 이상의 것에, 및/또는 V_H 또는 V_L 서열 중 하나 이상의 것에, 또는 V_H 또는 V_L 서열 중 하나 이상의 것이지만 CDR 서열 중 임의의 것 외부에 존재하는 것인 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 면역글로불린의 불변 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함하는 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 불변 영역은

a) 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하고/하거나,

- b) 유리 시스템인 잔기를 도입하고/하거나,
 - c) 활성화 Fc 수용체에 대한 결합을 증진시키고/시키거나,
 - d) 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 증진시키는
- 하나 이상의 변형을 포함하는 것인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 낙타화된 단일 도메인 항체, 디아바디, scFv, scFv 이량체, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv 단편, Fab, Fab', F(ab')₂, ds 디아바디, 나노바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체인 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 비아코어(Biacore)에 의해 측정될 때, 2×10^{-9} M 이하의 K_D 값으로 인간 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 비아코어에 의해 측정될 때, 5×10^{-9} M 이하의 K_D 값으로 인간 FGFR1b에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 유세포 분석법에 의해 측정될 때, 5 nM 이하의 EC₅₀으로 세포 표면 상에 발현된 인간 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 FGFR2b, 시노몰구스 원숭이 FGFR2b, 래트 FGFR2b, 및 마우스 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 표면 상에 발현된 인간 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있고, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨 비색 검정법에 의해 측정될 때, 15 nM 이하의 50% 성장 억제 농도(GI₅₀)로 상기 세포의 증식을 억제시킬 수 있는 항체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 접합체 모이어티에 연결된 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 접합체 모이어티는 치료제, 방사성 동위원소, 검출가능한 표지, 약동학적 변형 모이어티, 또는 정제 모이어티를 포함하는 것인 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, 치료제는 세포독성제를 포함하는 것인 항체.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 접합체 모이어티는 직접적으로 또는 링커를 통해 공유 부착된 것인 항체.

청구항 23

제22항에 있어서, 링커는 히드라진 링커, 디술폰드 링커, 이작용성 링커, 디펩티드 링커, 글루쿠로나이드 링커, 티오에테르 링커이고, 임의로 링커는 리소좀으로 절단가능한 디펩티드, 예컨대 발린-시트룰린(vc)인 항체.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 모이어티는 특정 타입의 표면 노출된 아미노산 잔기에 무작위로 부착되고, 임의로 특정 잔기는 시스테인 잔기 또는 리신 잔기인 항체.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 모이어티는 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 짧은 펩티드 태그, 또는 Asn297 글리칸을 통해 항체 분자 중 특이적으로 정의된 부위에 부착된 것인 항체.

청구항 26

FGFR 2b 및/또는 FGFR1b에 대한 결합에 대해 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항체와 경쟁하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 28

제27항에 있어서, 서열 번호 8, 10, 및 서열 번호 8 또는 10과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 서열.

청구항 29

제28항에 있어서, 상동체 서열은 서열 번호 8 또는 10에 의해 코딩된 것과 동일한 단백질을 코딩하는 것인 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 31

제30항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 32

제30항의 발현 벡터가 발현되는 조건하에서 제31항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체를 제조하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 숙주 세포에 의해 생산된 항체를 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 35

대상체에게 치료 유효량의, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체, 또는 제34항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 질환 또는 병태는 암이고, 임의로 암은 FGFR2b 및/또는 FGFR1b를 발현 또는 과발현하는 것을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 암은 난소암, 자궁내막암, 유방암, 폐암, 방광암, 결장암, 전립선암, 자궁경부암, 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포 암종, 신세포 암종, 두경부암, 중피종, 흑색종, 육종, 및 뇌 종양인 방법.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하, 또는 근육내 투여를 통해 이루어지는 것인 방법.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 40

샘플을 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계, 및 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계를 포함하는, 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 검출하는 방법.

청구항 41

대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 진단하는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 수득된 샘플을 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계;
- b) 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계;
- c) FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을, 대상체에서의 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태의 존재 또는 상태와 연관시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 42

대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 예측하는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 수득된 샘플을 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계;
- b) 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계;
- c) FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 길항체에 대한 대상체의 잠재적 반응성과 연관시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 43

FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 44

FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태 검출용 진단 시약의 제조에서의 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 45

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명의 기술분야

본 개시내용은 일반적으로 신규한 항인간 FGFR2b 항체에 관한 것이다.

배경 기술

배경기술

섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR: fibroblast growth factor receptor)는 4개의 구조적으로 관련된 유전자(FGFR1 내지 FGFR4)에 의해 코딩되는 막횡단 티로신 키나제이다. FGFR은 다양한 이소형으로 이어지는, 그의 mRNA의 다중 선택적 스플라이싱을 특징으로 한다(문헌 [Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271: 15292, 1996]; 또한, 인간 FGFR2 및 그의 이소폼의 서열에 대해 UniProtKB P21802 및 이소폼 P21802-1 내지 P21802-23; 인간 FGFR1 및 그의 이소폼의 서열에 대해 UniProtKB P11362 및 이소폼 P11362-1 내지 P11362-21 참조). FGFR은 상이한 Ig 유사 도메인 (α 이소폼은 Ig 유사 도메인 D1, D2, 및 D3, 3개 모두를 함유하고; β 이소폼은 D1을 제외한, 두 Ig 유사 도메인 D2 및 D3 도메인만을 함유한다)으로 구성된 세포외 리간드 결합 섹션, 막횡단 도메인, 및 세포내 티로신 키나제 촉매성 도메인으로 구성된 공통 구조적 특징을 가지고 있다. FGF는 주로 수용체의 D2 및 D3 영역을 통해 수용체에 결합한다. FGFR1-FGFR3에서, 모든 형태는 D3의 전반부를 포함하고, D3의 전반부만 함유하는 이소폼은 IIIa 형태로 표기되는 반면, D3의 후반부에는 2개의 대체 엑손이 사용될 수 있으며, 이로써, IIIb 및 IIIc 형태가 형성된다. 예를 들어, FGFR-1에서, 세 번째 Ig-유사 도메인을 코딩하는 엑손의 선택적 스플라이싱은 FGFR1IIIb 또는 FGFR1IIIc(또는 단지 "FGFR1b" 및 "FGFR1c") 스플라이스 형태를 생성하며, 이는 별개의 리간드 결합 선호도를 갖는다. FGFR2의 경우, 이들 형태는 각각 FGFR2IIIb 및 FGFR2IIIc(또는 단지 FGFR2b 및 FGFR2c)로 표기된다. FGFR2b는 상피 기원의 세포에서만 생성되고, FGFR2c는 조직 중간엽 세포에서만 생성된다. FGFR2의 FGFR2b 형태는 FGF1에 대해 고친화성 수용체이고, KGF 패밀리 구성원(예컨대, FGF 10, FGF22, 특히, FGF7)에 대해 특이적인 수용체인 반면; FGFR2c는 FGF1 및 FGF2 둘 모두에 잘 결합하지만, KGF 패밀리 구성원에는 결합하지 않는다(문헌 [Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:246, 1992]).

FGF는 FGFR에 대한 결합시, 다양한 세포 유형에서 특히 배 발생 동안 증식, 이동 및 분화를 비롯한 다양한 반응을 매개하고(문헌 [Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271:15292, 1996]), 성인의 경우, 조직 항상성 및 수복에 관여한다. KGF(FGF7) 및 KGFR(FGFR2IIIb)은 예컨대, 췌장암, 위암, 난소암 및 유방암과 같은 다양한 유형의 암에 관여하는 것으로 밝혀졌다. FGF7 및 FGFR2b는 췌장암에서 과발현되고(문헌 [Ishiwata et al., Am. J. Pathol. 153: 213, 1998]), 그의 공동 발현은 불량한 예후와 상관관계를 갖는다(문헌 [Cho et al., Am. J. Pathol. 170:1964, 2007]). FGFR2의 증폭 및 과발현은 특히 예후가 불량한, 미분화, 미만성 유형의 위암과 강력한 연관성이 있고, 소분자 화합물에 의한 FGFR2 활성의 억제제는 상기 암 세포의 증식을 강력하게 억제시켰다(문헌 [Kunii et al., Cancer Res. 68:2340, 2008]; [Nakamura et al., Gastroenterol. 131:1530, 2006]). FGFR2b 리간드 FGF1, FGF7 및 FGF10은 EOC 세포주에서 증식, 운동성 및 세포 사멸로부터의 보호를 유도하였고(문헌 [Steele et al., Growth Factors 24:45, 2006]), 이는 FGFR2b가 난소암에서 악성 표현형에 기여할 수 있다는 것을 시사하는 것이다. FGFR2b는 유방암 중 약 5%에서 높게 발현되고(문헌 [Finch and Rubin 2006]), MAPK 및 PI3K를 통한 신호전달 캐스케이드를 매개한다(문헌 [Moffa, Tannheimer et al. 2004]). 빈번한 활성화 FGFR2 돌연변이(예컨대, S252W)도 또한 다양한 암과 연관이 있는 것을 밝혀졌다.

구강 편평 세포 암종(문헌 [Freier et al., Oral Oncol. 43(1):60-6, 2007]), 유방암(문헌 [Turner et al., Cancer Res. 1;70(5):2085-94, 2010]), 식도 편평 세포 암종(문헌 [Ishizuka et al., Biochem Biophys Res Commun. 9;296(1):152-5, 2002]), 난소암(문헌 [Gorringe et al., Clin Cancer Res. 15;13(16):4731-9, 2007]), 방광암(문헌 [Simon et al., Cancer Res. 1;61(11):4514-9, 2001]), 전립선암(문헌 [Edwards et al., Clin Cancer Res. 1;9(14):5271-81 2003]), 및 주로 편평상피세포암 서브타입의 폐암(문헌 [Dutt et al., PLoS One. 6(6):e20351, 2011]; [Weir et al., Nature. 6;450(7171):893-8, 2007]; [Weiss et al., Sci Transl Med. 15;2(62):62ra93, 2010])을 비롯한, 다수의 암에서의 FGFR1의 증폭 또는 활성화가 보고되었다.

신규한 항FGFR2b 항체가 크게 요구되고 있다. 특히, FGFR2b 및 FGFR1b 모두에 결합할 수 있는 항체는 보고된 바 없는 것으로 여겨진다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 요약

[0009] 본 개시내용 전역에 걸쳐, 관사 "하나"("a," "an") 및 "그"는 본원에서 상기 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 1 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하는 것으로 사용된다. 예로서, "항체"는 하나의 항체 또는 1 초과(즉, 적어도 하나)의 항체를 의미한다.

[0010] 본 개시내용은 신규한 단일클론 항FGFR2b 항체, 그의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열, 및 그의 용도를 제공한다.

[0011] 한 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 1, 3 및 5로 구성된 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region) 서열; 및/또는 서열 번호 2, 4 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 단리된 항FGFR2b 항체로서, 여기서, 항체는 FGFR2b 및 FGFR1b 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있는 것인, 단리된 항FGFR2b 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 FGFR2c에 대한 검출가능한 결합 친화성을 갖지 않는다.

[0012] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 서열 번호 5의 중쇄 CDR3, 및/또는 서열 번호 6의 경쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 서열 번호 1, 3 및 5로 구성된 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H), 및/또는 서열 번호 2, 4 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 서열 번호 1, 3, 및 5를 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H), 및/또는 서열 번호 2, 4 및 6을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 서열 번호 7, 또는 서열 번호 7과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 서열 번호 9, 또는 서열 번호 9와 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 서열 번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하되, FGFR2b에 대한 및/또는 FGFR1b에 대한 특이적인 결합 친화성은 보유한다. 일부 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나는 CDR 서열 중 하나 이상의 것에, 및/또는 V_H 및 V_L 서열 중 하나 이상의 것에, 또는 V_H 및 V_L 서열 중 하나 이상의 것이지만 CDR 서열 중 임의의 것 외부에 존재한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 면역글로불린 불변 영역, 임의로, 인간 면역글로불린의 불변 영역, 바람직하게, 인간 IgG의 불변 영역, 더욱 바람직하게, 인간 IgG1의 불변 영역을 추가로 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 그의 불변 영역 내에 a) 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하고/하거나, b) 유리 시스테인 잔기를 도입하고/하거나, c) 활성화 Fc 수용체에 대한 결합을 증진시키고/시키거나, d) 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity)을 증진시키는 하나 이상의 변형을 추가로 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 글리코 조작된 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 비푸코실화(afucosylated)된 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 비푸코실화된 항체에는 Asn297의 푸코스가 결여되어 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 글리코 조작된 항체는 그의 비조작된 대응물보다 증진된 ADCC 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 일부 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간화 항체이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 하나 이상의 접합체 모이어티에 연결된다. 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 치료제, 방사성 동위원소, 검출가능한 표지, 약동학적 변형 모이어티, 또는 정제 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체 모이어티는 직접적으로 또는 링커를 통해 공유 부착된다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 FGFR2b 및/또는 FGFR 1b에 대한 결합에 대해 상기 기술된 항체와 경쟁하는, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 추가로 제공한다.

- [0020] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 8, 10, 및 서열 번호 8 내지 10과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동체 서열은 서열 번호 8 또는 10에 의해 코딩된 것과 동일한 단백질을 코딩한다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0022] 추가의 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0023] 추가의 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 본 개시내용의 발현 벡터가 발현되는 조건하에서 본 개시내용의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 숙주 세포에 의해 생산된 항체를 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0024] 추가의 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의, 본 개시내용의 항체 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암이고, 임의로, 암은 FGFR2b 및/또는 FGFR1b를 발현 또는 과발현하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 투여는 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하, 또는 근육내 투여를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 본 개시내용의 항체와 접촉시키는 단계, 및 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계를 포함하는, 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본 개시내용의 항체와 접촉시키는 단계; b) 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계; c) FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을, 대상체에서의 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태의 존재 또는 상태와 연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 진단하는 방법을 제공한다.
- [0030] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본 개시내용의 항체와 접촉시키는 단계; b) 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계; c) FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 길항제에 대한 대상체의 잠재적 반응성과 연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 예측하는 방법을 제공한다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 발현 조절이 도움이 되는 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본 개시내용의 항체의 용도를 제공한다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태 검출용 진단 시약의 제조에서의 본 개시내용의 항체의 용도를 제공한다.
- [0033] 추가의 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항체를 포함하는, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 검출용 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0034] **도면의 간단한 설명**

- 도 1. Ab 26c(도면에서 "26c"로 표시)의 인간 FGFR2b 또는 인간 FGFR1c에 대한 비아코어(Biacore) 결합 Ka, Koff, 및 친화도 K_D, 여기서, FPA144는 참조 비교를 위한 대조군 항체.
- 도 2. KATOIII 세포 상의 FGFR2b에 대한 키메라 Ab26c의 용량 의존적 결합의 유세포 분석법.
- 도 3. Ab 26c의 인간, 시노몰구스, 및 래트/마우스 FGFR2b에 대한 교차 종 결합.
- 도 4. Ab 26의 인간 FGFR의 다양한 패밀리 구성원에 대한 결합 선택성.

도 5. Ab 26c에 의한, 인간 FGFR2b로 안정적으로 형질감염된 Ba/F3 세포의 FGF7 유도성 세포 증식 억제, 여기서, 이소타입 인간 IgG1은 음성 대조군.

도 6. Ab 26c에 의한, FGFR2b 인산화 및 그의 하류 표적 ERK 인산화의 용량 의존적 하향조절.

도 7. KATOIII 세포에 대한 Ab 26c의 ADCC 활성.

도 8. LC038 환자 유래의 이중이식 폐암 모델에서 주 2회 10 mg/kg으로 i.p. 투약된 26c의 생체내 항종양 효능. FPA144를 비교군으로서 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명의 상세한 설명

[0036] 본 개시내용의 하기 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 실시양태를 예시하기 위한 것이다. 따라서, 논의된 특정 변형은 본 개시내용의 범주에 대한 제한으로 해석되지 않아야 한다. 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 등가물, 변경 및 변형이 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이며, 그러한 등가의 실시양태는 본원에 포함되어야 한다는 것을 이해하여야 한다. 공개문헌, 특허 및 특허 출원을 비롯한, 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0037] 정의

[0038] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 특정 항원에 결합하는 임의의 면역글로불린, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체, 이중특이적 항체 뿐만 아니라, 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 천연 무손상 항체는 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 입실론, 감마 및 뮤로 분류되며, 각 중쇄는 가변 영역(V_H) 및 제1, 제2, 및 제3 불변 영역(각각 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3})으로 구성되고; 포유동물의 경쇄는 λ 또는 κ 로 분류되는 반면, 각 경쇄는 가변 영역(V_L) 및 불변 영역으로 구성된다. 항체는 "Y"자 형상을 갖고, 여기서, Y의 줄기는 항체는 디설피드 결합을 통해 함께 결합된 두 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 구성된다. Y의 각 아암은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 쇠의 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역(CDR)으로 명명되는 3개의 고도로 가변적인 루프를 포함한다(경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함한다). 본원에 개시된 항체에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMGT, 코티아(Chothia), 또는 알-라지카니(Al-Lazikani)의 협약에 의해 정의 또는 확인될 수 있다(문헌 [Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997)]; [Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985)]; [Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987)]; [Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989)]; [Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]; [Marie-Paule Lefranc et al, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003)]; [Marie-Paule Lefranc et al, Immunome Research, 1(3), (2005)]; [Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)]). 3개의 CDR은 프레임워크 영역(FR: framework region)으로 알려진 측면 스트레치 사이에 삽입되며, 이는 CDR보다 고도로 보존되고, 추가적인 루프를 지원하는 스캐폴드를 형성한다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원 결합에 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 부류로 지정된다. 항체의 5가지 주요 부류 또는 이소타입은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 하는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이다. 주요 항체 부류 중 일부는 서브부류, 예컨대, IgG1(감마1 중쇄), IgG2(감마2 중쇄), IgG3(감마3 중쇄), IgG4(감마4 중쇄), IgA1(알파1 중쇄) 또는 IgA2(알파2 중쇄)로 분류된다.

[0039] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항원 결합 단편"은 하나 이상의 CDR을 포함하는 무손상 항체의 일부로부터 형성된 항체 단편, 또는 항원에 결합할 수 있지만, 무손상 천연 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편의 예로는 제한없이, 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디설피드 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설피드 안정화 디아바디(ds 디아바디), 단일 쇠 항체 분자(scFv), 단일 쇠 Fv-Fc 항체(scFv-Fc), scFv 이량체(2가 디아바디), 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체 및 2가 도메인 항체를 포함한다. 항원 결합 단편은 모체 항체가 결합하는 것과 동일한 항원에 결합할 수 있다.

- [0040] 항체와 관련하여 "Fab"는 디설피드 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄(가변 및 불변 영역 모두)로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다.
- [0041] "Fab'"는 힌지 영역의 일부를 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.
- [0042] "F(ab')₂"는 Fab'의 이량체를 지칭한다. 항체와 관련하여 "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 구성된다.
- [0043] "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 연결이 디설피드 결합인 디설피드 안정화 Fv 단편을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "(dsFv)₂" 또는 "(dsFv-dsFv)"는 3개의 펩티드 쇄를 포함하는데: 두 V_H 모이어티는 펩티드 링커(예컨대, 긴 가요성 링커)에 의해 연결되고, 각각 디설피드 브릿지를 통해 2개의 V_L 모이어티에 결합되어 있다. 일부 실시양태에서, dsFv-dsFv'는 각 디설피드 쌍형성 중쇄 및 경쇄가 상이한 항원 특이성을 갖는 이중특이적인 것이다.
- [0044] "단일 쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 구성된 조작된 항체를 지칭한다(문헌 [Huston JS *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)]).
- [0045] 항체와 관련하여 "Fc"는 디설피드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역에 결합된 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다. 항체의 Fc 부분은 예컨대, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC: complement dependent cytotoxicity)과 같은 다양한 이펙터 기능을 담당하지만, 항원 결합에는 작용하지 않는다.
- [0046] "단일 쇄 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 구성된 조작된 항체를 지칭한다.
- [0047] "낙타화된 단일 도메인 항체," "중쇄 항체," 또는 "HCAb"는 2개의 V_H 도메인을 함유하고, 경쇄는 함유하지 않는 항체를 지칭한다(문헌 [Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999)]; [Muyldermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001)]; WO94/04678; WO94/25591; 미국 특허 제6,005,079호). 중쇄 항체는 원래 낙타과(Camelidae)(낙타, 단봉 낙타, 라마)로부터 유래되었다. 비록 경쇄는 없지만, 낙타화된 항체는 확실한 항원 결합 레퍼토리를 갖는다(문헌 [Hamers-Casterman C. *et al.*, Nature. Jun 3;363(6428):446-8 (1993)]; [Nguyen VK. *et al.* "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002)]; [Nguyen VK. *et al.* Immunology. May;109(1):93-101 (2003)]). 중쇄 항체의 가변 도메인(VHH 도메인)은 적응 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 공지의 항원 결합 단위를 나타낸다(문헌 [Koch-Nolte F. *et al.*, FASEB J. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)]).
- [0048] "나노바디"는 통상적인 IgG의 중쇄 항체로부터의 한 VH 도메인, 및 2개의 중쇄 불변 도메인, 예를 들어, CH2 및 CH3으로 구성된 항체 단편을 지칭한다.
- [0049] "디아바디" 또는 "dAb"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 포함하며, 여기서, 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 중의 V_L 도메인에 연결된 V_H 도메인을 포함한다(V_H-V_L 또는 V_L-V_H)(예컨대, 문헌 [Holliger P. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15;90(14):6444-8 (1993)]; EP404097; WO93/11161). 너무 짧아 동일한 쇄 상의 두 도메인 사이의 쌍형성을 허용하지 않는 링커를 사용함으로써, 도메인은 강제로 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하게 된다. 항원 결합 부위는 동일하거나, 또는 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있다. 특정 실시양태에서, "이중특이적 ds 디아바디"는 2개의 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화하는 디아바디이다. 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 한 모이어티의 V_H가 나머지 다른 모이어티의 V_L과 조직화되고, 동일한 항원(또는 에피토프) 또는 다른 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 또 다른 V_H-V_L 모이어티와 이량체화된 V_H-V_L(펩티드 링커에 의해 연결)을 포함하는 2가 디아바디 또는 2가 ScFv(BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 V_{H1} 및 V_{L1}이 조직화되도록 V_{L1}-V_{H2}(이 또한 펩티드 링커에 의해 연결)와 회합된 V_{H1}-V_{L2}(펩티드 링커에 의해 연결)를 포함하는 이중특이적 디아바디이고, 각 조직화된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖는다.
- [0050] 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 한 모이어티의 V_H가 나머지 다른 모이어티의 V_L과 조직화되고, 동일한 항원

(또는 에피토프) 또는 다른 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 또 다른 V_H-V_L 모이어티와 이량체화된 V_H-V_L (펩티드 링커에 의해 연결)을 포함하는 2가 디아바디 또는 2가 ScFv(BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 V_{H1} 및 V_{L1} 이 조직화되도록 $V_{L1}-V_{H2}$ (이 또한 펩티드 링커에 의해 연결)와 회합된 $V_{H1}-V_{L2}$ (펩티드 링커에 의해 연결)를 포함하는 이중특이적 디아바디이고, 각 조직화된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖는다.

[0051] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정 경우에, 2개 이상의 V_H 도메인은 펩티드 링커와 공유 결합되어 2가 또는 다가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 2개의 V_H 도메인은 동일하거나, 또는 상이한 항원을 표적화할 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 바, 용어 "키메라"는 일부는 한 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄이고, 나머지는 다른 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 의미한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 예컨대, 마우스와 같은 비인간 동물로부터 유래된 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비인간 동물은 포유동물, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 기니피그 또는 햄스터이다.

[0053] 본원에서 사용되는 바, 용어 "인간화"는 항체 또는 항원 결합 단편이 비인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역을 포함하고, 적용가능한 경우, 불변 영역이 인간으로부터 유래된 것 의미한다.

[0054] 본원에서 사용되는 바, "2가"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭하고; 용어 "1가"는 단 하나의 단일 항원 결합 부위만을 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭하고; 용어 "다가"는 다중 항원 결합 부위를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0055] 본원에서 사용되는 바, "이중특이적" 항체는 2개의 상이한 단일클론 항체로부터 유래된 단편을 갖고, 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 인공 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다. 2개의 에피토프는 동일한 항원에 존재할 수도 있거나, 2개의 상이한 항원에 존재할 수도 있다.

[0056] 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 사용되는 바, 용어 "FGFR"은 섬유아세포 성장 인자 수용체 패밀리의 구성원 (FGFR1-FGFR4) 중 임의의 것 또는 그들 모두를 포함하며, 임의의 형태의 FGFR, 예를 들어, 1) 천연의 프로세싱되지 않은 FGFR 분자, "전장" FGFR 쇠 또는 FGFR의 자연적으로 발생된 변이체, 예를 들어, 대립유전자 변이체 포함; 2) 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의 형태의 FGFR, 예컨대, 상이한 스플라이싱 형태, 예를 들어, FGFR1b, FGFR1c, FGFR2a, FGFR2b, FGFR2c 등; 또는 3) 재조합 방법을 통해 생성된 FGFR 서브유닛의 단편(예컨대, 말단절단된 형태, 세포외/막횡단 도메인) 또는 변형된 형태(예컨대, 돌연변이화된 형태, 글리코실화된/PEG화된 형태, His-태그/면역형광 융합된 형태)를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 바, "FGFR"은 포유동물, 예컨대, 영장류(예컨대, 인간, 원숭이) 및 설치류(예컨대, 마우스 및 래트)를 비롯한, 임의의 척추동물 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0057] 용어 "FGFR2IIIb" 및 "FGFR2b"는 상호교환적으로 사용되며, FGFR2의 서브타입 IIIb 스플라이스 형태를 지칭한다. FGFR2b의 예시적인 서열은 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)(인간) FGFR2b 단백질(예컨대, 신호 펩티드를 갖는 전구체 서열, 진뱅크 수탁 번호: NP_075259.4); 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)(래트) FGFR2b 단백질(예컨대, 전체 서열, 진뱅크 수탁 번호: NP_001103363.1); 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)(마우스) FGFR2b 단백질(예컨대, 전체 서열, 진뱅크 수탁 번호: NP_963895.2)을 포함한다.

[0058] "FGFR2IIIc" 또는 "FGFR2c"는 상호교환적으로 사용되며, FGFR2의 서브타입 IIIc 스플라이스 형태를 지칭한다. FGFR2c의 예시적인 서열은 인간 FGFR2c 단백질(예컨대, 전구체 서열, 진뱅크 수탁 번호: NP_000132.3); 라투스 노르베기쿠스(래트) FGFR2c 단백질(전체 서열, 진뱅크 수탁 번호: NP_001103362.1); 무스 무스쿨루스(마우스) FGFR2c 단백질(전체 서열, 진뱅크 수탁 번호: NP_034337.2)을 포함한다.

[0059] 용어 "FGFR1IIIbb" 및 "FGFR1b"는 상호교환적으로 사용되며, FGFR1의 서브타입 IIIb 스플라이스 형태를 지칭한다. FGFR1b의 예시적인 서열은 호모 사피엔스(인간) FGFR1b 단백질(예컨대, 신호 펩티드를 갖는 전구체 서열, UniProtKB 수탁 번호: P11362-19); 무스 무스쿨루스(마우스) FGFR1b 단백질(예컨대, 신호 펩티드를 갖는 전구체 서열, UniProtKB 수탁 번호: P16092-5)을 포함한다.

[0060] 용어 "항FGFR2b 항체"는 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 FGFR2b 및 FGFR1b 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있지만, FGFR2c 및 FGFR1c에 결합하

지 않거나, 또는 FGFR2c 및 FGFR1c에는 더 낮은 수준으로 결합한다(예컨대, FGFR2c 또는 FGFR1c에 대한 결합 친화도는 FGFR2b 또는 FGFR1b에 대한 결합 친화도보다 적어도 10배 더 낮거나, 적어도 50배 더 낮거나, 적어도 100배 더 낮거나, 적어도 200배 더 낮다). 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 FGFR2c에 대해 검출가능한 결합 친화성을 갖지 않는다.

[0061] 본원에서 사용되는 바, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"라는 용어는 두 분자 사이, 예컨대, 예를 들어, 항체와 항원 사이의 비무작위인 결합 반응을 지칭한다. 본원에 제공된 항체와 항원 결합 단편의 결합 친화도는 K_D 값으로 나타낼 수 있으며, 이는 항원과 항원 결합 분자(예컨대, 항체 및 항원 결합 단편) 사이의 결합이 평형에 도달하였을 때의 회합 속도 대비 해리 속도의 비(k_{off}/k_{on})로 표현된다. 항원 결합 친화도(예컨대, K_D)는 예를 들어, 비아코어 기술(표면 플라즈몬 공명 기술에 기초, 예를 들어, 문헌 [Murphy, M. et al, Current protocols in protein science, Chapter 19, unit 19.14, 2006] 참조), 키넥사(Kinexa) 기술(예를 들어, 문헌 [Darling, R. J., et al, Assay Drug Dev. Technol., 2(6): 647-657 (2004)]), 및 유세포 분석법을 비롯한, 당업계의 적합한 방법을 사용하여 적절히 측정될 수 있다.

[0062] 본원에서 사용되는 바, "결합에 대하여 경쟁"할 수 있는 능력은 두 분자(예컨대, 인간 FGFR2b 및 항FGFR2b 항체) 간의 결합 상호작용을 임의의 검출가능한 정도로(예컨대, 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 만큼) 억제시킬 수 있는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0063] 당업자는 주어진 항체가 본 개시내용의 항체(예컨대, 하기 정의되는 Ab 26, 또는 Ab 26c)와 FGFR 2b 및/또는 FGFR1b에 대한 결합에 대해 경쟁하는지 여부를 과도한 실험 없이 결정할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0064] 본원에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 항체의 결합 대상이 되는 항원 상의 대한 특정 원자 또는 아미노산 그룹을 지칭한다.

[0065] 아미노산 서열과 관련하여 "보존적 치환"은 물리화학적 특성이 유사한 측쇄를 갖는 상이한 아미노산 잔기로 아미노산 잔기를 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 사이, 중성 친수성 측쇄를 갖는 잔기(예컨대, Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 사이, 산성 측쇄를 갖는 잔기(예컨대, Asp, Glu) 사이, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예컨대, His, Lys 및 Arg) 사이, 또는 방향족 측쇄를 갖는 잔기(예컨대, Trp, Tyr 및 Phe) 사이에서 이루어질 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 일반적으로 단백질 입체형태 구조에서는 유의적인 변이를 일으키지 않으므로, 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있다.

[0066] 본원에서 사용되는 바, 용어 "상동체" 및 "상동성"은 상호교환가능하며, 최적으로 정렬되었을 때, 또 다른 서열과 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열(또는 상보적 가닥), 또는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0067] 아미노산 서열(또는 핵산 서열)과 관련하여 "서열 동일성(%)"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우, 동일한 아미노산(또는 핵산)의 개수가 최대 수치에 도달하도록 갭을 도입한 후, 참조 서열 중 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산(또는 핵산) 잔기의 비율(%)로서 정의된다. 아미노산 잔기의 보존적 치환은 동일한 잔기로 간주되거나 고려되지 않을 수 있다. 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성(%)을 측정하기 위한 정렬은 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 도구, 예컨대, BLASTN, BLASTP(미국 국립 생명공학 정보 센터(NCBI: National Center for Biotechnology Information) 웹사이트에서 이용가능, 또한 문헌 [Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)]; [Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 참조), ClustalW2(유럽 생물정보학 연구소(European Bioinformatics Institute), 웹사이트에서 이용가능, 또한 문헌 [Higgins D.G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996)]; [Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 참조), 및 ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 도구에 의해 제공되는 디폴트 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 예를 들어, 적절한 알고리즘을 선택함으로써 정렬에 적절하게 파라미터를 맞춤형으로 적합화시킬 수 있다.

[0068] "단리된" 물질은 자연 상태에서부터 인공으로 변경된 것이다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연에 존재하는 경우, 이는 그의 원래 환경으로부터 변경, 또는 제거되었거나, 또는 그 둘 모두가 이루어진 것이다. 예를 들어, 자연적으로 살아있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니고, 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 실질적으로 순수한 상태로 존재하기 위해 그의 자연 상태의 공존 물질로부터 충분히 분리되었다면, 이는 "단리된" 것이다. "단리된 폴리뉴클레오티드 서열"은 단리된 폴리뉴클레오티드 분자의 서열을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "단리된 항체"는 전기영동 방법(예컨대, SDS-PAGE, 등전위 포커싱, 모

세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 방법(예컨대, 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 측정될 때, 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 순도를 갖는 항체를 지칭한다.

- [0069] 본원에서 사용되는 바, "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역이 그의 이펙터, 예컨대, C1 복합체 및 Fc 수용체에 결합하는 데 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 예시적인 이펙터 기능으로는 C1 복합체 상의 C1q 및 항체의 상호작용에 의해 유도된 보체 의존성 세포독성(CDC); 이펙터 세포 상의 Fc 수용체의 항체의 Fc 영역의 결합에 의해 유도된 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC); 및 식균 작용을 포함한다.
- [0070] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 이펙터 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체 또는 항원 결합 단편을 인식한 후, 이어서, 표적 세포의 용해를 일으키는 세포-매개 반응을 지칭한다. "ADCC 활성"은 표적 세포에 결합된 항체 또는 항원 결합 단편이 상기 기술된 바와 같은 ADCC 반응을 유발할 수 있는 능력을 지칭한다.
- [0071] "표적 세포"는 일반적으로 Fc 영역의 C-말단인 단백질 부분을 통해 Fc 영역을 포함하는 항체가 특이적으로 결합하는 결합 대상인 세포이다. "이펙터 세포"는 하나 이상의 Fc 수용체를 발현하고, 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈액 단핵구(PBMC: peripheral blood mononuclear cell), 자연 살해(NK: natural killer) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고; 여기서, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 그의 천연 공급원, 예컨대, 당업계에 공지된 바와 같이, 혈액 또는 PBMC로부터 분리될 수 있다.
- [0072] 본원에서 사용되는 바, "백터"는 그 안에 함유된 원하는 핵산 단편의 복제/클로닝을 가능하게 하거나, 적절한 세포 숙주 내로 도입된 것과 같은 상기의 원하는 핵산 단편에 의해 코딩된 단백질의 발현을 가능하게 하는 폴리뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 백터는 클로닝 백터 및 발현 백터 둘 모두를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "발현 백터"는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 상기 단백질이 발현될 수 있도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 비히클을 지칭한다. 발현 백터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선별가능한 요소 및 리포터 유전자를 비롯한, 발현 제어를 위한 다양한 요소를 함유할 수 있다. 추가로, 백터는 복제 기점을 포함할 수 있다.
- [0073] 본원에서 사용되는 바, "숙주 세포"라는 어구는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 백터가 도입된 세포를 지칭한다.
- [0074] 본원에서 사용되는 바, 병태를 "치료하는" 또는 그의 "치료"는 병태의 예방 또는 완화, 병태 발병 또는 발생 속도의 저속화, 병태의 발생 위험 감소, 병태와 연관된 증상 발생 예방 또는 지연, 병태와 연관된 증상의 감소 또는 종료, 병태의 완전한 또는 부분적 퇴행 생성, 병태 치유, 또는 그의 일부 조합을 포함한다.
- [0075] 본원에서 사용되는 바, "FGFR 2b 및/또는 FGFR 1b 관련된" 질환 또는 병태는 FGFR2b 조절제 및/또는 FGFR1b 조절제를 이용하는 치료에 민감하거나, 또는 발현 또는 FGFR 돌연변이 또는 FGFR 활성과 관련된 임의의 질환 또는 병태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, FGFR 2b 및/또는 FGFR 1b 관련된 질환 또는 병태는 암, 및 임의로, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 발현 또는 발현 상승에 대해 양성인 암이다.
- [0076] 본원에서 사용되는 바, "암"은 악성 세포 성장 또는 신생물, 비정상적인 증식, 침윤 또는 전이를 특징으로 하는 임의의 의학적 상태를 지칭하고, 고형 종양 및 비고형 암 모두를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "고형 종양"은 신생물성 및/또는 악성 세포의 고형 덩어리를 지칭한다. "비고형 암"은 혈액암, 예컨대, 백혈병, 림프종, 골수종 및 다른 혈액암을 지칭한다. 암 또는 종양의 예로는 혈액암(예를 들어, 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종 및 B 세포 림프종), 구강 암종(예를 들어, 구순 암종, 설 암종 또는 인두 암종), 소화 기관(예를 들어, 식도, 위, 소장, 결장, 대장 또는 직장) 종양, 복막, 간 및 담도, 췌장, 호흡계, 예컨대, 후두 또는 폐(소세포 및 비소세포), 뼈, 결합 조직, 피부(예컨대, 흑색종), 유방, 생식 기관(나팔관, 자궁, 자궁경부, 고환, 난소 또는 전립선), 요로(예컨대, 방광 또는 신장), 뇌 및 내분비선, 예컨대, 갑상선의 암 또는 종양을 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 난소암, 자궁내막암, 유방암, 폐암(소세포 또는 비소세포), 방광암, 결장암, 전립선암, 자궁경부암, 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포 암종(간암), 신세포 암종(신장암), 두경부암, 증피종, 흑색종, 육종, 뇌 및 종양(예컨대, 신경교종, 예컨대, 교모세포종)으로부터 선택된다.
- [0077] "약학적으로 허용되는"이라는 용어는 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들) 및/또는 염이 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분과 화학적으로 및/또는 물리적으로 양립가능하고, 그의 수용자와 생리적으로 화합성일 수 있다는 것을 나타낸다.

[0078] **항FGFR2b 항체**

[0079] 본 개시내용은 Ab 26의 하나 이상의(예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의) CDR 서열을 포함하는 항FGFR2b 항체를 제공한다. 표 1은 Ab 26의 CDR 서열을 보여주는 것이다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "Ab "26"은 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 9의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 단일클론 항체를 지칭한다. Ab 26은 FGFR2b 및 FGFR1b 둘 모두에 특이적으로 결합한다.

표 1

표 1. Ab 26의 CDR 아미노산 서열

Ab 26	HCDR1 서열 번호 1	HCDR2 서열 번호 3	HCDR3 서열 번호 5
	SGYYW	YITYDGSNNYNPSLKN	VYYYGSGNFDV
	LCDR1 서열 번호 2	LCDR2 서열 번호 4	LCDR3 서열 번호 6
	KASQSVSNDVA	YASNRYT	HQDHTSPFT

[0080]

[0081] CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 알려져 있지만, 6개의 CDR 모두가 필수 불가결하거나, 변경불가능한 것은 아니라는 것이 밝혀졌다. 다시 말해, Ab 26에서 하나 이상의 CDR을 교체하거나, 변경하거나, 또는 변형하는 것이 가능하지만, FGFR, 특히, FGFR2b 및 FGFR1b에 대한 특이적 결합 친화성은 실질적으로 보유한다.

[0082] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 표 1에 제공된 바와 같은 하나 이상의 CDR 영역에 하나 이상의 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 상기 변이체는 그의 모체 항체의 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대한 특이적인 결합 친화성은 보유하지만, 예컨대, 더 높은 항원 결합 친화성 또는 글리코실화 가능성 감소와 같이 특성에서 하나 이상의 개선을 보일 수 있다.

[0083] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 서열 번호 5의 중쇄 CDR3 서열, 및 임의로, 서열 번호 6의 경쇄 CDR3을 제공한다. 중쇄 CDR3 영역은 항원 결합 부위의 중앙에 위치하고, 항원과 가장 많이 접촉하고, 항원에 대한 항체의 친화력에 가장 많은 자유 에너지를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 중쇄 CDR3은 다중 다양화 기전에 의해 길이, 아미노산 조성 및 입체형태의 관점에서 항원 결합 부위 중 단연코 가장 다양한 CDR인 것으로 여겨진다(문헌 [Tonegawa S. Nature. 302:575-81. (1983)]). 중쇄 CDR3의 다양성은 대부분의 항체 특이성(문헌 [Xu JL, Davis MM. Immunity. 13:37-45 (2000)]) 뿐만 아니라, 바람직한 항원 결합 친화성(문헌 [Schier R, etc. J Mol Biol. 263:551-67 (1996)])을 생성하는 데 충분하다.

[0084] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체가 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 상기 항체는 적합한 프레임워크 영역(FR) 서열을 추가로 포함한다. 표 1에 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 수득된 것이지만, 예컨대, 재조합 기술과 같이, 당업계에 공지된 적합한 방법을 사용하여 특히, 마우스, 인간, 래트, 토끼와 같은 임의의 적합한 종의 임의의 적합한 FR 서열에 이식될 수 있다.

[0085] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 면역글로불린 불변 영역, 임의로, 인간 면역글로불린, 임의로, 인간 IgG를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 불변 영역은 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지, 및/또는 CH2-CH3 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 Cκ 또는 Cλ를 포함한다.

[0086] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 마우스 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체이다. 본원에서 사용되는 바, "Ab 26c"는 각각 인간 중쇄 불변 영역 및 인간 경쇄 불변 영역에 융합된, 서열 번호 7의 마우스 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9의 마우스 경쇄 가변 영역을 포함하는, Ab 26에 기초한 키메라 항체를 지칭한다.

[0087] 표 2 및 표 3은 예시적인 항체의 가변 영역 서열을 보여준다.

표 2

표 2. 예시적인 항체의 가변 영역의 아미노산 서열

Ab 26/26c	V_H (서열 번호 7)
	DVHLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKL EWMGYITYDGSNNYNPSLKNRLSITRDTSKNQFFLQLSSLTTEDTAT YFCARVYYYGSGNFDVWGTGTTVTVSS
	V_L (서열 번호 9)
	SIVMTQTPKILLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLL IYYASNRYTGVDPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCHQDHTS PFTFGSGTKLEIK

[0088]

표 3

표 3. 예시적인 항체의 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

Ab 26/26c	V_H : 뉴클레오티드 서열(서열 번호 8)
	gatgtacacctcaggagtcaggacctggcctcgtgaaacctctcagtcctctctcacctgctctgt cactggctactccatcaccagtggttattactggaactggatccggcagttccagggaacaacctgga atggatgggtacataacctacgatggtageaataactacaacctctctcaaaaatcgactctccatc actcgtgacacatctaagaaccagttttctgcaattgagttctttgacaactgaggacacagccacat actctgtgcaagagtttattactacggtagtgggaacttcgatgtctggggcacaggaccacggta ccgtctcctca
	V_L : 뉴클레오티드 서열(서열 번호 10)
	agtattgtgatgaccgagctcccaaatcctgctgtatcagcaggagacaggggtaccataacctgc aaggccagtcagagtgtagtaatgatgtagcttggtaccaacagaagccaggcagtcctcaaaact gctgatataattatgcatctaactgctacactggagtcctgatcctcactggcagtgatgggacg gatttcacctccaccatcagcactgtgcaggtggaagacctggcagtttattctgtcaccaggatcatac ctctccattcagttcggctcggggacaaagtggaataaaaa

[0089]

[0090] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 본원에 제공된 하나 이상의 가변 영역 서열에 하나 이상의 변형 또는 치환을 함유할 수 있지만, FGFR2b 및/또는 FGFR 1b에 대한 특이적인 결합 친화성은 보유한다. 특정 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열, 또는 가변 영역 서열 중의 치환(들) 중 적어도 하나(또는 그 모두)는 보존적 치환(들)을 포함한다.

[0091] 상기 목적을 달성하기 위해 당업계에 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 기술을 사용하여 항체 변이체(예컨대, Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리를 생성하고, 발현시킨 후, 이어서, 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대한 결합 친화성에 대해 스크리닝할 수 있다. 또 다른 예의 경우, 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대한 항체의 결합을 가상으로 모의하고, 결합 계면을 형성하는 항체 상의 아미노산 잔기를 확인할 수 있다. 상기 잔기는 결합 친화성 감소를 막기 위해 치환에서 회피되거나, 또는 더 강력한 결합을 제공하기 위해 치환에 대해 표적화될 수 있다.

[0092] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 서열 번호 1-6 내의 하나 이상의 CDR 서열, 및/또는 하나 이상의 FR 서열 중 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 치환이 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 대해 이루어진다.

[0093] 특정 실시양태에서, 항FGFR2b 항체는 서열 번호 1-6에 열거된 것(또는 것들)과 적어도 80%(예컨대 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR 서열을 포함하고, 동시에, 그의 모체 항체와 유사하거나, 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준의 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대한 결합 친화도를 보유한다.

[0094] 특정 실시양태에서, 항FGFR2b 항체는 표 2에 열거된 것(또는 것들)과 적어도 80%(예컨대 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 가변 영역 서열을 포함하고, 동시에, 그의 모체 항체와 유사하거나, 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준의 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대한

결합 친화도를 보유한다. 일부 실시양태에서, 표 2에 열거된 가변 영역 서열 중 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입, 또는 결실된다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 밖의 영역에서 (예컨대, FR에서) 일어난다.

- [0095] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 예컨대, ADCC 또는 CDC와 같은 이펙터 기능을 유도할 수 있는 불변 영역을 포함한다. 예컨대, ADCC 및 CDC와 같은 이펙터 기능은 FGFR을 발현하는 세포에 세포독성을 유발할 수 있으며, 예컨대, Fc 수용체 결합 검정법, C1q 결합 예컨대, 및 세포 용해 예컨대, 과 같은 다양한 예컨대, 을 사용하여 평가될 수 있다. 특정 실시양태에서, 불변 영역은 ADCC를 유도하는 것으로 공지된 IgG1 이소타입의 것이다.
- [0096] 특정 실시양태에서, 항FGFR2b 항체는 불변 영역에 증진된 ADCC를 제공하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "증진된 ADCC"는 상기 정의된 ADCC 기전에 의해 표적 세포를 둘러싸고 있는 배지 중 주어진 항체 농도에서 주어진시간에 용해되는 표적 세포수의 증가, 및/또는 ADCC 기전에 의해 주어진시간에 주어진 개수의 표적 세포의 용해를 달성하는 데 소요되는, 표적 세포를 둘러싸고 있는 배지 중 항체 농도의 감소로 정의된다.
- [0097] 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 예컨대, 미국 특허 제5,500,362호; 문헌 [Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)] 및 [Hellstrom et al, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)]; 미국 특허 제5,821,337호; 또는 문헌 [Bruggemann et al, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)]에 기술된 것과 같은 시험관내 ADCC 검정법이 수행될 수 있다. 대안적으로, 비방사성 검정 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, 유세포 분석법을 위한 ACT1™ 비방사성 세포독성 검정법(Cell Technology Inc.: 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재); 및 CytoTox 96® 비방사성 세포독성 검정법(Promega: 미국 위스콘신주 매디슨 소재)). 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예컨대, 동물 모델에서, 예컨대, 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같이 평가될 수 있다.
- [0098] ADCC 증진을 위한 다양한 방법이 선행 기술에서 기술된 바 있다. 예를 들어, Fc 영역 중 아미노산 잔기의 서브 세트가 Fc γR에 대한 결합에 관여하는 것으로 입증되었으며, 예컨대, Fc 영역 중 하기 아미노산 잔기(잔기의 EU 넘버링): (1) Lys274-Arg301 및 Tyr407-Arg416(문헌 [Sarmay et al. (1984) Mol. Immunol., 21:43-51] 및 [Gergely et al. (1984) Biochem. Soc. Tans.,12: 739-743]); (2) Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, 및 Ala327-Ile332(문헌 [Sondermann et al. (2000) Nature, 406:267-273]), 및 (3) T256, K290, S298, E333, K334, A339(문헌 [Shields et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:6591-6604]; 및 미국 특허 출원 제2004/0228856호)가 인간 Fc γRIIIA에 대한 결합에 관여한다. 상기 열거된 아미노산 잔기는 예를 들어, 문헌 [Shields et al. (2001), J Biol Chem 9(2), 6591-6604]에서와 같이 ADCC 활성 증진을 위해 돌연변이화될 수 있고, Fc 변이체 T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, 및 A339T는 천연 서열과 비교하여 ADCC 활성을 증진시키는 것으로 입증되었다.
- [0099] 대안적으로, 항체의 글리코실화 형태를 조작함으로써 증진된 ADCC 활성을 획득할 수 있다. 이펙터 세포의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합을 증진시킴으로써 항체의 ADCC 활성을 증진시키는 다수의 글리코실화 형태가 보고되었다. 상이한 글리코실화 형태는, 상이한 당류를 포함하거나(예컨대, 푸코스와 같은 한 유형의 당류가 결핍되어 있거나, 또는 예컨대, 만노스와 같은 한 유형의 당류를 높은 수준으로 갖거나), 또는 상이한 구조(예컨대, 다양한 분지형 구조, 예컨대, 비안테나리(2개 분지), 트리안테나리(3개 분지) 또는 테트라안테나(4개 분지) 구조)를 갖는, 항체에 부착된 여러 형태의 글리칸 중 임의의 것을 포함한다.
- [0100] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 글리코 조작된 것이다. "글리코 조작된" 항체 또는 항원 결합 단편은 그의 글리코 조작되지 않은 대응물과 비교하여 증가 또는 감소된 글리코실화 수준, 글리코실화 형태의 변화, 또는 그 둘 모두를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리코 조작된 항체는 그의 비조작된 대응물보다 증진된 ADCC 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증진된 ADCC 활성은 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 또는 75% 더 높은 FGFR2b 발현 세포 용해를 특징으로 한다.
- [0101] 항체는 펩티드 골격에 대한 임의의 조작(예컨대, 아미노산 서열에 대한 변형, 및/또는 개별 아미노산의 측쇄기에 대한 변형), 및/또는 숙주 세포주를 통한 번역 후 변형에 대한 조작(예컨대, 글리코실화 패턴에 대한 변형)을 포함하는 당업계에 공지된 방법에 의해 글리코 조작될 수 있다. 항체의 글리코실화 조작에 의해 ADCC 활성을 변경하는 방법 또한 당업계에 기술되어 있다(예를 들어, 문헌 [Weikert et al. (1999) Nature Biotech., 17:116-121]; [Shields R. L. et al. (2002), J. Biol. Chem., 277: 26733-26740]; [Shinkawa et al. (2003), J Biol Chem., 278, 3466-3473]; [Ferrara et al. (2006), Biotech. Bioeng., 93, 851-861]; [Yamane-Ohnuki

et al.(2004), Biotech Bioeng., 87, 614-622]; [Niwa et al.(2006), J Immunol Methods 306, 151-160]; [Shinkawa T. et al, J. Biol. Chem, (2003), 278: 3466-3473] 참조).

[0102] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 글리코 조작된 항체는 비푸코실화된 것이다(즉, 푸코스를 함유하지 않는다). 여러 연구에서 비푸코실화된(즉, 푸코스 결핍, 또는 비푸코실화된) 항체가 Fc γ RIII에 대해 증가된 결합을 보였고, 이로써, 더 높은 ADCC 활성을 유발하는 것으로 나타났다(문헌 [Shields et al. (2002) J. Biol. Chem., 277:26733-26740]; [Shinkawa et al. (2003) J. Biol. Chem., 278:3466-3473]; 및 유럽 특허 출원 공개 제 1176195호). 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 비푸코실화된 항체에는 (카바트 넘버링(Kabat numbering)에 기초하여) 중쇄의 아스파라긴 297(Asn297)에 푸코스가 결합되어 있다. Asn297은 항체의 IgG1 이소타입의 Fc 영역의 각 CH₂ 도메인에서 발견되는 보존된 N 연결 글리코실화 부위이다(문헌 [Arnold et al., Glycobiology and Medicine, 564:27-43, 2005]).

[0103] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 글리코 조작된 항체는 고 만노스 글리코실화 형태(예컨대, 만노스 e5, 만노스 7, 8, 9 글리칸)를 특징으로 한다. 고 만노스 글리코실화 형태는 ADCC 활성을 증진시키는 것으로 입증되었다(문헌 [Yu et al. (2012), Landes Bioscience, mAbs 4:4, 475-487]).

[0104] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 그의 불변 영역에 a) 글리코실화 부위를 도입하거나, 제거하고/하거나, b) 유리 시스테인 잔기를 도입하고/하거나, c) 활성화 Fc 수용체에 대한 결합을 증진시키고/시키거나, d) ADCC를 증진시키는 하나 이상의 변형을 추가로 포함한다.

[0105] 항FGFR2b 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 탄수화물 모이어티(예컨대, 올리고당 구조)가 부착될 수 있는 측쇄를 갖는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N 연결 또는 O 연결 글리코실화이다. N 연결은 아스파라긴 잔기, 예를 들어, 트리펩티드 서열, 예컨대, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한, 임의의 아미노산이다) 중의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭한다. O 연결 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 하이드록시아미노산에, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭한다. 천연 글리코실화 부위의 제거는, 예를 들어, 항체의 서열에 존재하는 상기 기술된 트리펩티드 서열(N 연결 글리코실화 부위의 경우) 또는 세린 또는 트레오닌 잔기(O 연결 글리코실화 부위의 경우) 중 하나가 치환되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다. 상기 트리펩티드 서열 또는 세린 또는 트레오닌 잔기를 도입함으로써 유사한 방식으로 새로운 글리코실화 부위를 생성할 수 있다.

[0106] 본원에 제공된 항FGFR2b 항체 또한 하나 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인 조작된 변이체를 포함한다. 유리 시스테인 잔기는 디설피드 브릿지의 일부가 아닌 것이다. 시스테인 조작된 변이체는 예를 들어, 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해 조작된 시스테인의 부위에서 예를 들어, 다른 것들 중에서도 특히 세포독성 및/또는 이미징 화합물, 표지 또는 방사성 동위원소와의 접합에 유용하다. 유리 시스테인 잔기를 도입하기 위해 항체를 조작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, W02006/034488을 참조한다.

[0107] 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 또한 그의 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에 하나 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항FGFR2b 항체는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 pH 의존적 결합을 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 상기 변이체는 산성 pH에서 FcRn에 결합하고, 이를 통해 수송 리소좀에서의 분해를 회피한 후, 전위되어 세포 밖으로 방출될 수 있기 때문에, 연장된 약동학적 반감기를 가질 수 있다. FcRn과의 결합 친화도를 개선시키기 위해 항체 및 그의 항원 결합 단편을 조작하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Vaughn, D. et al, Structure, 6(1): 63-73 (1998)]; [Kontermann, R. et al, Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010]; [Yeung, Y. et al, Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010)]; 및 [Hinton, P. et al, J. Immunology, 176:346-356 (2006)]을 참조한다.

[0108] **결합 특성**

[0109] 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 FGFR2b 및 FGFR1b에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 10^{-6}$ M(예컨대, $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 9 \times 10^{-10}$ M, $\leq 8 \times 10^{-10}$ M, $\leq 7 \times 10^{-10}$ M, $\leq 6 \times 10^{-10}$ M, $\leq 5 \times 10^{-10}$ M, $\leq 4 \times 10^{-10}$ M, $\leq 3 \times 10^{-10}$ M, $\leq 2.5 \times 10^{-10}$ M, $\leq 2 \times 10^{-10}$ M, $\leq 1.5 \times 10^{-10}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, $\leq 9 \times 10^{-11}$ M, $\leq 5 \times 10^{-11}$ M, \leq

4×10^{-11} M, $\leq 3 \times 10^{-11}$ M, $\leq 2 \times 10^{-11}$ M, 또는 $\leq 10^{-11}$ M)의 결합 친화도(K_D)로 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 특이적으로 결합한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 비아코어에 의해 측정될 때, 5×10^{-9} M 이하, 4×10^{-9} M 이하, 3×10^{-9} M 이하, 2×10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 4×10^{-10} M 이하, 3×10^{-10} M 이하, 2×10^{-10} M 이하, 10^{-10} M 이하, 5×10^{-11} M 이하, 또는 4×10^{-11} M 이하, 3×10^{-11} M 이하, 2×10^{-11} M 이하의 결합 친화도(K_D)로 인간 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0111] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 비아코어에 의해 측정될 때, 5×10^{-9} M 이하, 4×10^{-9} M 이하, 3×10^{-9} M 이하, 2×10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 4×10^{-10} M 이하, 3×10^{-10} M 이하, 2×10^{-10} M 이하, 10^{-10} M 이하, 5×10^{-11} M 이하, 또는 4×10^{-11} M 이하, 3×10^{-11} M 이하, 2×10^{-11} M 이하의 결합 친화도(K_D)로 인간 FGFR1b에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0112] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항체는 시노물구스 원숭이 FGFR 대응물, 래트 FGFR 대응물, 및 마우스 FGFR 대응물과 교차 반응한다.

[0113] 항체의 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대한 결합은 또한 항체의 최대 효과(예컨대, 결합 또는 억제 등)의 50%가 관찰되는 항체 농도를 지칭하는 "반수 최대 유효 농도"(EC₅₀) 값으로 나타낼 수 있다. EC₅₀ 값은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 샌드위치 검정법, ELISA, 웨스턴 블롯, 유세포 분석 검정법 및 다른 결합 검정법에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 ELISA에 의하면 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1.5 nM 이하, 1 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.6 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.4 nM 이하, 0.3 nM 이하, 0.2 nM 이하, 또는 0.1 nM 이하의 EC₅₀(즉, 50% 결합 농도)으로 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 유세포 분석법에 의하면, 10 nM 이하, 9 nM 이하, 8 nM 이하, 7 nM 이하, 6 nM 이하, 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.5 nM 이하, 또는 0.3 nM 이하의 EC₅₀(즉, 50% 결합 농도)으로 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 특이적으로 결합한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 상이한 종의 FGFR2b에 대한 교차 반응성이고, 예를 들어, 인간 FGFR2b, 시노물구스 원숭이 FGFR2b, 래트 FGFR2b, 및/또는 마우스 FGFR2b에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0115] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 진단 및/또는 치료 용도를 제공하기에 충분한 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 대하여 특이적인 결합 친화도를 갖는다.

[0116] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 그의 리간드에 대한 결합을 차단함으로써 예를 들어, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 발현 세포의 증식 억제를 비롯한, 생물학적 활성을 제공한다.

[0117] 증식 억제 효과는 그의 최대 증식 억제 효과의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 지칭하는 "50% 성장 억제 농도"(GI₅₀) 값으로 나타낼 수 있다. GI₅₀ 값은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시 페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨(MTS) 비색 검정법(미국 특허 제5,185,450호에 기술된 것 참조), 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 검정법(문헌 [Berridge et al. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127-52] 참조), 알라마블루(Alamarblue) 검정법(미국 특허 제5,501,959에 기술된 것 참조) 및 어세이 가이드스 매뉴얼(Assay Guidance Manual)(문헌 [Sittampalam et al., editors. 2004])에 기술된 임의의 다른 방법에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 MTS에 의해 측정될 때, 15 nM 이하, 14 nM 이하, 13 nM 이하, 12 nM 이하, 11 nM 이하, 10 nM 이하, 9 nM 이하, 8 nM 이하, 7 nM 이하, 6 nM 이하, 5 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 50% 성장 억제 농도(GI₅₀)로 인간 FGFR2b가 그의 표면 상에 발현된 세포의 증식을 억제시킬 수 있다.

[0118] **항원 결합 단편**

[0119] 본 개시내용은 또한 FGFR2b 및/또는 FGFR1b에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단편을 제공한다. 다양한 유형의 항원 결합 단편이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 그의 CDR 및 가변 서열이 서열 번호 1-6에 및 표 2에 제시되어 있는 예시적인 항체, 및 변형 또는 치환을 포함하는 그의 상이한 변이체를 비롯한, 본원에 제

공된 항FGFR2b 항체에 기초하여 개발될 수 있다.

[0120] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항FGFR2b 항원 결합 단편은 낙타화된 단일 도메인 항체, 디아바디, 단일 쇠 Fv 단편(scFv: single chain Fv), scFv 이량체, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv 단편, Fab, Fab', F(ab')₂, 이중특이적 항체, ds 디아바디, 나노바디, 도메인 항체, 단일 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체이다.

[0121] 상기 항원 결합 단편을 생성하는 데 다양한 기술이 사용될 수 있다. 예시적인 방법으로 무손상 항체의 효소적 소화(예컨대, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조), 숙주 세포, 예컨대, E. 콜라이(*E. Coli*)(예컨대, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편인 경우)에 의한 재조합 발현, 상기 논의된 바와 같은 파지 디스플레이로부터의 스크리닝(예컨대, ScFv의 경우), 및 두 Fab'-SH 단편의 화학적 커플링을 통해 F(ab')₂ 단편을 형성하는 것(문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)])을 포함한다. 항체 단편을 생성하는 다른 기술도 숙련가에게 자명할 것이다.

[0122] 특정 실시양태에서, 항원 결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은 예를 들어, WO 93/16185; 미국 특허 제 5,571,894호; 및 제5,587,458호에 기술되어 있다. ScFv는 아미노 또는 카복실 말단에서 이펙터 단백질에 융합되어 융합 단백질을 제공할 수 있다(예를 들어, [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조).

[0123] **접합체**

[0124] 일부 실시양태에서, 항FGFR2b 항체는 접합체 모이어티를 추가로 포함한다. 접합체 모이어티는 본원에 제공된 항체에 연결될 수 있다. 접합체 모이어티는 항체에 부착될 수 있는 비단백질성 또는 소화성 모이어티이다. 다양한 접합체 모이어티가 본원에 제공된 항체에 연결될 수 있는 것으로 고려된다(예를 들어, 문헌 ["Conjugate Vaccines,"Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)] 참조). 접합체 모이어티는 다른 방법 중에서도 특히 공유 결합, 친화성 결합, 인터칼레이션, 배위 결합, 착물화, 회합, 블렌딩 또는 첨가에 의해 항체에 연결될 수 있다.

[0125] 특정 실시양태에서, 항FGFR2b 항체는 링커를 통해 하나 이상의 접합체에 연결된다. 특정 실시양태에서, 링커는 히드라진 링커, 디술폰드 링커, 이작용성 링커, 디펩티드 링커, 글루쿠로나이드 링커, 또는 티오에테르 링커이다. 특정 실시양태에서, 링커는 리소좀으로 절단가능한 디펩티드, 예컨대, 발린-시트룰린(vc)이다.

[0126] 접합체 모이어티는 치료제(예컨대, 세포독성제), 방사성 동위원소, 검출가능한 표지(예컨대, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 또는 효소-기질 표지), 약동학적 변형 모이어티, 또는 정제 모이어티(예컨대, 자성 비드 또는 나노입자)일 수 있다.

[0127] 검출가능한 표지의 예로는 형광 표지(예컨대, 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린 또는 Texas Red), 효소-기질 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루세리페라제, 글루코아미라제, 리소자임, 당류 옥시다제, β-D-갈락토시다제), 방사성 동위원소, 발광 표지, 발색단 모이어티, 디콕시게닌, 비오틴/아비딘, DNA 분자 또는 검출용 금속을 포함할 수 있다.

[0128] 방사성 동위원소의 예로는 ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H, ¹¹¹In, ¹¹²In, ¹⁴C, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ²¹¹At, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P 및 다른 란탄족을 포함할 수 있다. 방사성 동위원소 표지된 항체는 수용체 표적 영상화 실험에 유용하다.

[0129] 특정 실시양태에서, 약동학적 변형 모이어티는 항체의 반감기를 증가시키는 데 도움이 되는 제거 개질제일 수 있다. 예시적인 예로는 수용성 중합체, 예컨대, PEG, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1 초과의 중합체가 부착된 경우, 동일하거나, 다른 분자일 수 있다.

[0130] 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 예컨대, 자성 비드 또는 나노입자와 같은 정제 모이어티일 수 있다.

[0131] **항체-약물 접합체**

[0132] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체는 세포독성제에 접합된 상기 항FGFR2b 항체 중 임의의 것을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC: antibody-drug conjugate)이다. 다시 말해, 접합체 모이어티는 세포독성제를 포함한다.

- [0133] ADC는 예를 들어, 암 치료에서 세포독성제의 국소 전달에 유용할 수 있다. 이를 통해 종양에 세포독성제를 표적화된 방식으로 전달할 수 있고, 그 안의 세포내 축적을 가능하게 하며, 이는 상기 비접합 세포독성제의 전신 투여가 제거하고자 하는 종양 세포 뿐만 아니라, 정상 세포에 허용할 수 없는 수준의 독성을 초래할 수 있는 경우에 특히 유용하다(문헌 [Baldwin et al., (1986), Lancet, 603-05]; [Thorpe, (1985), 단일클론 Antibodies, 84]; [Pinchera et al. (ed.s), Biological And Clinical Applications, 475-506]; [Syrgios and Epenetos (1999), Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172]; 및 미국 특허 제4,975,278호).
- [0134] "세포독성제"는 암 세포에 유해하거나, 또는 암 세포를 손상시키거나, 사멸시킬 수 있는 임의의 작용제일 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포독성제는 임의로 화학요법제(예컨대, 성장 억제제, DNA 알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린 결합제 또는 다른 항암제), 독소, 또는 고반응성 방사성 동위원소이다.
- [0135] 세포독성제의 예로는 거대 분자 박테리아 독소 및 식물 독소, 예컨대, 예를 들어, 디프테리아 독소, 외독소 A 쉐(슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신, 아브린, 모데신, 알파-사르신, 알류라이트 포르디(*Aleurites fordii*), 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PARI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시달리스(*saponaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센(예컨대, WO 93/21232 참조)을 포함한다. 이러한 거대 분자 독소는 예를 들어, 문헌 [Vitetta et al (1987) Science, 238:1098]에 기술된 바와 같이 당업계에 공지된 방법을 사용하여 본원에 제공된 항체에 접합될 수 있다.
- [0136] 세포독성제는 또한 예컨대, 겔다나마이신과 같은 소분자 독소 및 화학요법 약물(문헌 [Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드(EP 1391213; 문헌 [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 칼리케아미신(문헌 [Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342]), 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 그의 유사체, 향대사물질(예컨대, 메토크렉세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예컨대, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부술판, 디브로모만넛톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예컨대, 다우노루비신(이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)) 및 향유사분열제(예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴(예컨대, 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE: monomethyl auristatin E) 및 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF: Monomethyl auristatin F)), 트리코테센, 및 CC1065, 및 세포독성 활성을 갖는 그의 유도체일 수 있다. 상기 독소는 예를 들어, US7,964,566; 문헌 [Kline, T. et al, Pharmaceutical Research, 32(11): 3480-3493]에 기술된 바와 같이, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 본원에 제공된 항체에 접합될 수 있다.
- [0137] 세포독성제는 또한 고 방사성 동위원소일 수 있다. 예로는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위 원소를 포함한다. 방사성 동위원소의 항체에 대한 접합 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 적합한 리간드 시약을 통해 이루어진다(예컨대, WO94/11026; 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)] 참조). 리간드 시약은 방사성 동위원소 금속에 결합, 킬레이트화, 또는 다르게는, 착체화할 수 있는 킬레이팅 리간드를 가지며, 이는 또한 항체 또는 항원 결합 단편의 시스템인 티올과 반응성인 작용기를 갖는다. 예시적인 킬레이팅 리간드는 DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA(Macrocylics: 미국 텍사스주 델러스 소재)를 포함한다.
- [0138] 특정 실시양태에서, 항체는 링커, 예를 들어, 히드라진 링커, 디술폰드 링커, 이작용성 링커, 디펩티드 링커, 글루쿠로나이드 링커 또는 티오에테르 링커를 통해 접합체 모이어티에 부착된다.
- [0139] 예시적인 이작용성 링커는 예컨대, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄

유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 포함한다.

- [0140] 특정 실시양태에서, 링커는 특정 생리학적 환경하에서 절단가능하며, 이로써, 세포에서 세포독성제의 방출을 촉진한다. 예를 들어, 링커는 산 불안정 링커, 펩티다제 민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드 함유 링커일 수 있다(문헌 [Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 제5,208,020). 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기, 예컨대, 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함할 수 있다. 링커 내의 아미노산 잔기는 자연적으로 또는 비자연적으로 발생된 아미노산 잔기일 수 있다. 상기 링커의 예로는 발린-시트룰린(ve 또는 val-cit), 발린-시트룰린(ve 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌(af 또는 ala-phe), 글리신-발린-시트룰린(gly-ylal-cit), 글리신-글리신-글리신(gly-gly-gly), 발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카로닐("vc-PAB")을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어, 중앙 연관 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그의 선택성이 디자인되고, 최적화될 수 있다.
- [0141] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 ADC에서, 항체(또는 항원 결합 단편)는 약 1 대 약 20, 약 1 대 약 6, 약 1 대 약 3, 약 1 대 약 2, 약 1 대 약 1, 약 2 대 약 5, 또는 약 3 대 약 4의 항체:세포독성제 비로 하나 이상의 세포독성제에 접합된다.
- [0142] 본원에 제공된 ADC는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 친핵성 기는 먼저 이작용성 링커 시약과 반응한 후, 이어서, 세포독성제에 연결되거나, 또는 그 반대의 방식으로, 즉, 먼저 세포독성제의 친핵성 기를 이작용성 링커와 반응시킨 후, 이어서, 항체에 연결된다.
- [0143] 특정 실시양태에서, 세포독성제는 본원에 제공된 항체의 유리 시스템의 시스템인 티올과 반응할 수 있는 티올 반응성 작용기를 함유할 수 있다(또는 함유하도록 변형될 수 있다). 예시적인 티올 반응성 작용기는 예를 들어, 말레이미드, 아이오도아세트아미드, 피리딜 디술피드, 할로아세틸, 숙신이미딜 에스테르(예컨대, NHS, N-하이드록시숙신이미드), 이소티오시아네이트, 술폰일 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 또는 펜타플루오로페닐 에스테르, 포스포라미다이트를 포함한다(문헌 [Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2]; [Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London]; [Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2]; [Hermanson, G. in *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]).
- [0144] 세포독성제 또는 항체는 연결 시약과 반응한 후, 접합되어 ADC를 형성할 수 있다. 예를 들어, 세포독성제의 N-하이드록시숙신이미딜 에스테르(NHS)는 수행, 단리, 정제 및/또는 특징화될 수 있거나, 동소에서 형성되고, 항체의 친핵성 기와 반응할 수 있다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 세포독성제 및 항체는 한 단계에서 동소 활성화 및 반응에 의해 연결되어 ADC를 형성할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 비오틴에 접합된 후, 이어서, 아비딘에 접합된 제2 접합체에 간접적으로 접합될 수 있다.
- [0146] 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 항체 내의 특정 타입의 표면 노출된 아미노산 잔기, 예를 들어, 시스템인 잔기 또는 리신 잔기에 무작위로 부착된다.
- [0147] 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 약물 대 항체 비(DAR: drug-to-antibody ratio) 및 부착 부위에 대해 높은 균질성 및 배치 대 배치 일관성을 ADC 집단에 제공하기 위해 특이적으로 정의된 부위에 부착된다. 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 짧은 펩티드 태그, 또는 Asn297 글리칸을 통해 항체 분자 중 특이적으로 정의된 부위에 부착된다. 예를 들어, 접합은 에피토프 결합 부분 외부의 특정 부위에 있을 수 있다.
- [0148] 부위 특이적 부착은 항체의 특정 부위에 있는 천연 아미노산을 약물 모이어티가 접합될 수 있는 시스템과 같은 아미노산으로 치환하거나, 또는 그를 항체의 특정 부위 전후에 도입함으로써 달성될 수 있다(문헌 [Stimmel et al. (2000), *JBC*, 275(39):30445-30450]; [Junutula et al. (2008), *Nature Biotechnology*, 26(8):925-932]; 및 W02006/065533 참조). 대안적으로, 부위 특이적 접합은 문헌 [Axup et al. ((2012), *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(40):16101-16116)]에 의해 기술된 바와 같이 그의 중쇄 및/또는 경쇄 중 특정 부위에 비천연 아미노산(예컨대, p-아세틸페닐알라닌(pAcF), N6-((2-아지도에톡시)카보닐)-L-리신, p-아지도메틸-L-페닐알라닌(pAMF), 및 셀레노시스테인(Sec))을 함유하도록 항체를 조작함으로써 달성될 수 있으며, 여기서, 비천연 아미노

산은 직교 화학이 링커 시약 및 약물을 부착시키도록 디자인될 수 있다는 추가적인 이점을 제공한다. 상기 기술된 두 부위 특이적 접합 방법에서 유용한 예시적인 특정 부위(예컨대, 경쇄 V205, 중쇄 A114, S239, H274, Q295, S396 등)은 다수의 선행 기술, 예를 들어, 문헌 [Strop et al. (2013), *Chemistry & Biology*, 20, 161-167]; [Qun Zhou (2017), *Biomedicines*, 5, 64]; [Dimasi et al. (2017), *Mol. Pharm.*, 14, 1501-1516]; W02013/093809 및 W02011/005481에 기술되어 있다. 또 다른 부위 특이적 ADC 접합 방법은, 상대적으로 소수성인 세포독성제를 항체의 아미노산 백본에 커플링하는 대신, 약물-링커가 CH2 도메인에 위치하는 Asn297 글리칸(예컨대, 푸코스, 갈락토스, N-아세틸갈락토사민, N-아세틸글루코사민, 시알산)에 접합될 수 있는 것인 글리칸 매개 접합이다. 고유한 짧은 펩티드 태그(예컨대, LLQG, LPETG, LCxPxR)를 특정 부위(예컨대, N 말단 또는 C 말단 영역 중의 부위)를 통해 항체에 도입하려는 노력이 계속 이어져 왔으며, 이어서, 이는 펩티드 태그 중의 특정 아미노산이 관능화되고, 약물-링커에 커플링될 수 있게 허용한다(문헌 [Strop et al. (2013), *Chemistry & Biology*, 20, 161-167]; [Beerli et al. (2015), *PLoS ONE*, 10, e0131177]; [Wu et al. (2009), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3000-3005]; [Rabuka (2012), *Nat. Protoc.* 7, 1052-1067]).

[0149] **폴리뉴클레오티드 및 제조합 방법**

[0150] 본 개시내용은 본원에 제공된 항FGFR2b 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0151] 본원에서 사용되는 바, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보핵산(DNA: deoxyribonucleic acid) 또는 리보핵산(RNA: ribonucleic acid) 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 자연적으로 발생된 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 특정 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체(예컨대, 축퇴성 코돈 치환), 대립유전자, 오솔로그, SNP, 및 상보적 서열 뿐만 아니라, 분명하게 명시된 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 선택된 하나 이상의 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(문헌 [Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)]; [Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)]).

[0152] 특정 실시양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 8, 및/또는 10에 제시된 바와 같은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열, 및/또는 적어도 80%(예컨대 적어도 85%, 88%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)의 서열 동일성을 갖는 그의 상동성 서열, 및/또는 오직 축퇴성 치환만을 갖고, 본원에 제공된 예시적인 항체의 가변 영역을 코딩하는 것인, 그의 변이체를 포함한다. 단일클론 항체를 코딩하는 DNA는 종래 방법을 사용하여 (예컨대, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 쉽게 단리되고, 시퀀싱된다. 코딩 DNA는 또한 합성 방법에 의해 획득될 수도 있다.

[0153] 항FGFR2b 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드(예컨대, 표 3에 제시된 것과 같은 서열 포함)는 당업계에 공지된 제조합 기술을 사용하여 추가 클로닝(DNA 증폭) 또는 발현을 위해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 하기: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터(예컨대, SV40, CMV, EF-1 α), 및 전사 종결 서열 중 하나 이상의 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 벡터는 또한 바이러스 입자, 리포솜 또는 단백질 코팅을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 세포 내로의 그의 진입을 돕는 물질을 포함할 수 있다.

[0154] 본 개시내용은 항체를 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터(예컨대, SV40, CMV, EF-1 α) 및 적어도 하나의 선별 마커를 함유하는 벡터(예컨대, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)를 제공한다. 벡터의 예로는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대, 효모 인공 염색체(YAC: yeast artificial chromosome), 박테리아 인공 염색체(BAC: bacterial artificial chromosome) 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC: P1-derived artificial chromosome), 박테리오파지, 예컨대, 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 발현 벡터로서 사용되는 동물 바이러스의 카테고리는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예컨대, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 배칼로바이러스, 유두종바이러스 및 파포바이러스(예컨대, SV40)를 포함한다. 예시적인 플라스미드는 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등

을 포함한다.

- [0155] 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원의 벡터에서 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기술된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 장내세균과, 예를 들어 대장균, 엔테로박터, 에르위니아, 클렙시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 예를 들어 살모넬라 티피무리움, 세라티아, 예를 들어, 엔테로박테리아세아에 (*Enterobacteriaceae*), 예컨대, 에스케리키아(*Escherichia*), 예컨대, E. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예컨대, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예컨대, 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 및 시겔라(*Shigella*) 뿐만 아니라, 바실리(*Bacilli*), 예컨대, B. 섭틸리스(*B. subtilis*) 및 B. 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대, P. 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)를 포함한다.
- [0156] 원핵생물 이외에도, 예컨대, 사상성 진균 또는 효모와 같은 진핵성 미생물은 항FGFR2b 항체 코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 일반적인 빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 예컨대, 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예컨대, 예로서, K. 락티스(*K. lactis*), K. 프라길리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), K. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), K. 위케라미(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178), K. 왈티(*K. waltii*)(ATCC 56,500), K. 드로스필라룸(*K. drosophilorum*)(ATCC 36,906), K. 썬모톨레란스(*K. thermotolerans*), 및 K. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*yarrowia*)(EP 402,226); 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈바니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예컨대, 슈바니오마이세스 오시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상성 진균, 예컨대, 예로서, 뉴로스포라, 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대, A. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 A. 니저(*A. niger*)와 같은, 다수의 다른 속, 종, 및 계통이 보편적으로 이용가능하고, 본원에서 유용하다.
- [0157] 본원에 제공된 항체 또는 항원 단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된 것이다. 무척추 동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 배콜로바이러스 균주 및 변이체; 및 숙주, 예컨대, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(애벌레), 아에데스 아에지피티(*Aedes aegypti*)(모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*)(모기), 드로스필라 멜라노가스테르(*Drosophila melanogaster*)(초파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)로부터의 상용하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예컨대, 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하며, 상기 바이러스는 특히, 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원에서의 바이러스로서 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용될 수 있다.
- [0158] 그러나, 척추동물 세포에 대한 관심이 가장 높았고, 배양물(조직 배양물)에서 척추동물 세포의 증식이 통상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예로는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(293 또는 현탁 배양물 중에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK(baby hamster kidney cell), ATCC CCL 10); 마우스 골수종 세포주(NS0, 문헌 [Galfre and Milstein (1981), *Methods in Enzymology*, 73:3-46]; Sp2/0-Ag14, ATCC CRL-1581); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO(Chinese hamster ovary cell)); 문헌 [Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포(TM4, 문헌 [Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐tpvh(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT(mouse mammary tumor) 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(문헌 [Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)가 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 배양 세포, 예컨대, CHO 세포, BHK 세포, 또는 NS0 세포이다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 글리코 조작된 항체를 생산할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포주는 번역 후 변형 동안 필요한 글리코실화 기구를 제공할 수 있다. 상기 숙주 세포주의 예로는 글리코실화 관련 효소, 예컨대,

글루코사미닐트랜스퍼라제(예컨대, β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)), 글리코실트랜스퍼라제(예컨대, β (1,4)-갈락토실트랜스퍼라제(GT)), 시알릴트랜스퍼라제(예컨대, α (2,3)-시알릴트랜스퍼라제(ST)), 만노시다제(예컨대, α -만노시다제 II(ManII)), 푸코실트랜스퍼라제(예컨대, 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자(FUT8), (1,3) 푸코실트랜스퍼라제), 원핵성 GDP-6-데옥시-D-리코소-4-헥실로스 환원효소(RMD), GDP-푸코스 수송체(GFT: GDP-fucose transporter)의 활성이 천연적으로, 또는 유전자 조작을 통해 변경된(증가 또는 감소된) 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0160] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 기능성 FUT8의 결핍, 이중성 GnTIII의 과발현, 원핵성 GDP-6-데옥시-D-리코소-4-헥실로스 환원효소(RMD)의 발현, 또는 기능성 GFT의 결핍을 특징으로 한다. FUT8 녹아웃 숙주 세포주는 푸코실화가 결핍되어 있고, 비푸코실화된 항체를 생산한다. 숙주 세포주에서의 GnTIII의 과발현(예를 들어, (Roche)에 의한 Glycart 기술 참조)으로 이등분된 비푸코실화된 글리코실화 형태의 항체가 형성된다. (예컨대, ProBioGen AG로부터의 Glymax[®] 시스템에서와 같이) RMD의 발현은 푸코스 드노보 생합성을 억제시키고, 그 결과, 상기 숙주 세포주에 의해 생산된 항체 또한 감소된 푸코실화를 나타낸다. CHO 세포주의 GFT 녹아웃(예컨대, Beijing Mabworks Biotech의 기술 참조)은 푸코스 드노보 및 푸코스 재이용 생합성 경로를 모두 차단하여 푸코실화를 감소시킨다.

[0161] 숙주 세포는 항FGFR2b 항체 생산을 위한 상기 기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터 유도, 형질전환체 선택 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자 증폭을 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 당업계에 공지된 상동성 제조법에 의해 생성될 수 있다.

[0162] 본원에 제공된 항체를 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예컨대, 햄즈 F10(Ham's F10)(Sigma), 최소 필수 배지(MEM: Minimal Essential Medium)(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 및 둘베코스 변형 이글 배지(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium)가 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 추가로, 문헌 [Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979)], [Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 재발행 30,985에 기술된 배지 중 임의의 것이 숙주 세포를 위한 배양 배지로 사용될 수 있다. 상기 배지 중 임의의 것은 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제(예컨대, HEPES), 뉴클레오티드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, GENTAMYCIN[™] 약물), 미량 원소(일반적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨) 및 글루코스 또는 등가 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 예컨대, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 미리 사용된 것이며, 이는 당업자에게 자명할 것이다.

[0163] 제조법 기술을 사용할 때, 항체는 세포내에서, 주변세포질 공간에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우, 제1 단계로 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 파편이 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]에는 E. 콜라이의 주변 세포질 공간으로 분비되는 항체를 단리시키는 방법이 기술되어 있다. 간략하면, 세포 페이스트를 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸술폰플루오라이드(PMSF)의 존재하에 약 30 min 동안에 걸쳐 해동시킨다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로 상기 발현 시스템으로부터의 상청액을 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 예컨대, PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질 분해를 억제시키기 위해 상기 단계 중 임의의 단계에 포함될 수 있으며, 항생제는 외래 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0164] 세포로부터 제조된 항FGFR2b 항체는 예를 들어, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있으며, 여기서, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다.

[0165] 특정 실시양태에서, 고체 상에 고정화된 단백질 A는 항체 및 그의 항원 결합 단편의 면역친화성 정제에 사용된다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 의존한다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2 또는 감마4 중쇄에 기반한 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다(문헌 [Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 감마3에 권장된다(문헌 [Guss et al., *EMBO J.* 5:1567 1575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착된 매트릭스는 대부분

아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 예컨대, 조절 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정적인 매트릭스를 통해 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 유속은 더 빨라질 수 있고, 프로세싱 시간은 더 짧아질 수 있다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드 ABX(Bakerbond ABX)TM 수지(J. T. Baker: 미국 뉴저지주 필립스버그 소재)가 정제에 유용하다. 예컨대, 이온 교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)TM 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포키싱, SDS-PAGE, 및 항산암모늄 침전과 같은 다른 단백질 정제 기술 또한 회수하고자 하는 항체에 따라 이용가능하다.

[0166] 임의의 예비 정제 단계(들) 후, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 바람직하게는 저염 농도(예컨대, 약 0-0.25 M 염)에서 수행되는, pH 약 2.5-4.5의 용리 완충제를 사용하여 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용시킬 수 있다.

[0167] **약학 조성물**

[0168] 본 개시내용은 본원에 제공된 항FGFR2b 항체 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다.

[0169] 본원에 개시된 약학 조성물에 사용하기 위한 약학적 허용 담체는 예를 들어, 약학적으로 허용되는 액체, 겔, 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 향미생물제, 등장제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁화제/디스펜딩제(dispending agent), 격리제 또는 킬레이팅제, 희석제, 애주번트, 부형제 또는 비독성 보조 물질, 당업계에 공지된 다른 성분, 또는 그의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0170] 적합한 성분은 예를 들어, 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 보존제, 활택제, 향미제, 증점제, 착색제, 유화제 또는 안정제, 예컨대, 당 및 사이클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제로는 예를 들어, 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 티오글리세롤, 티오글리콜산, 티오소르비톨, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편 및 접합체를 포함하는 조성물에 예컨대, 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제를 포함하는 것은 항체 또는 항원 결합 단편의 산화를 감소시킨다. 이러한 산화 감소는 결합 친화성의 손실을 방지하거나, 또는 감소시켜, 항체 안정성을 개선하고, 저장 수명을 최대화시킨다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 항체 및 예컨대, 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제를 포함하는 조성물을 제공한다. 본원에 제공된 바와 항체 또는 항원 결합 단편을 예컨대, 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제와 혼합함으로써 상기 항체 또는 항원 결합 단편의 산화를 방지하고/하거나, 저장 수명을 연장시키고/시키거나, 효능을 개선시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0171] 추가로 예시하기 위해, 약학적 허용 담체는 예를 들어, 수성 비히클, 예컨대, 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 텍스트로스 주사액, 멸균수 주사액, 또는 텍스트로스 및 락테이트 링거 주사액, 비수성 비히클, 예컨대, 식물성 고정유, 면실유, 옥수수유, 참기름 또는 땅콩유, 정균 또는 정진균 농도의 향미생물제, 등장제, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로스, 완충제, 예컨대, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대, 중황산나트륨, 국소 마취제, 예컨대, 프로카인 하이드로클로라이드, 현탁화제 및 분산제, 예컨대, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대, 폴리소르베이트 80(TWEEN-80), 격리제 또는 킬레이팅제, 예컨대, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA(에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알콜, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 수산화나트륨, 염산, 시트르산, 또는 락트산을 포함할 수 있다. 담체로 사용되는 향미생물제는 페놀 또는 크레졸, 수은제, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함하는 다중 용량 용기의 약학 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 비독성 보조 물질은 예를 들어, 습윤화제 또는 유화제, pH 완충화제, 안정제, 용해도 증진제, 또는 예컨대, 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 또는 사이클로덱스트린과 같은 작용제를 포함할 수 있다.

[0172] 약학 조성물은 액체 액체, 현탁제, 에멀전, 환제, 캡슐, 정제, 지속 방출 제제 또는 산제일 수 있다. 경구용 제제는 표준 담체, 예컨대, 약학적 등급의 만네토, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 소듐 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다.

[0173] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 주사가 가능한 조성물로 제제화된다. 주사 가능한 약학 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예컨대, 예를 들어, 액체 액체, 현탁제, 또는 에멀전, 또는 액체 액체, 현탁제, 또는 에멀전을 생성하

기에 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 주사용으로 준비된 멸균 및/또는 비발열성 액제, 사용 직전에 용매와 조합될 준비가 된 멸균 건조 가용성 제품, 예컨대, 동결건조된 산제(이하 정제 포함), 주사용으로 준비된 멸균 현탁제, 사용 직전에 비히클과 조합될 준비가 된 멸균 건조 불용성 제품, 및 멸균 및/또는 비발열성 에멀전을 포함할 수 있다. 액제는 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0174] 특정 실시양태에서, 단위 용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 바늘이 있는 주사기에 패키징된다. 비경구 투여용의 모든 제제는 당업계에 공지되어 있고, 실행되는 바와 같이, 멸균성이어야 하고, 비발열성이어야 한다.

[0175] 특정 실시양태에서, 멸균 동결건조된 산제는 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 적합한 용매에 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 산제, 또는 산제로부터 제조된 재구성된 액제의 안정성 또는 다른 약리학적 성분을 개선시키는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제로는 물, 텍스트로스, 소르비탈, 프럭토스, 옥수수 시럽, 크실리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 작용제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 용매는 완충제, 예컨대, 시트레이트, 인산나트륨 또는 인산칼륨, 또는 한 실시양태에서, 대략 중성 pH인, 당업자에게 공지된 상기와 같은 다른 완충제를 함유할 수 있다. 이어서, 액제를 멸균 여과한 후, 이어서, 당업자에게 공지된 표준 조건하에 동결건조시킴으로써 바람직한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 액제는 동결건조를 위해 바이알에 분배될 것이다. 각각의 바이알은 항FGFR2b 항체 또는 그의 조성물의 단일 투여량 또는 다중 투여량을 함유할 수 있다. 정확한 샘플 채집 및 정확한 투여를 촉진시키기 위해 용량 또는 용량 세트(예컨대, 약 10%)에 필요한 것보다 초과로 소량(예컨대, 약 10%)을 바이알에 과충전시키는 것이 허용된다. 동결건조된 산제는 약 4°C 내지 실온과 같은 적절한 조건에서 보관될 수 있다.

[0176] 동결건조된 산제를 주사용수로 재구성함으로써 비경구 투여용 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 재구성을 위해, 멸균 및/또는 비발열성 물 또는 적합한 다른 액체 담체가 동결건조된 분말에 첨가된다. 정확한 양은 제공되는 선택된 요법에 따라 다르며, 경험적으로 결정될 수 있다.

[0177] **사용 방법**

[0178] 본 개시내용은 또한 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 병태 또는 장애 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에 대해 치료 유효량의, 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 투여하여 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 병태 또는 장애를 치료 또는 예방하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, FGFR 관련된 (예컨대, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된) 병태 또는 장애는 암이고, 임의로, 암은 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 발현 또는 과발현을 특징으로 한다.

[0179] 암의 예로는 난소암, 자궁내막암, 유방암, 폐암(소세포 또는 비소세포), 결장암, 전립선암, 자궁경부암, 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포 암종(간암), 신세포 암종(신장암), 두경부암, 중피종, 흑색종, 육종, 뇌종양(예컨대, 신경교종, 예컨대, 교모세포종), 및 혈액암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0180] 일부 실시양태에서, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 병태 또는 장애는 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 발현 또는 과발현을 특징으로 하는 암이다.

[0181] FGFR2b 및/또는 FGFR1b 발현 또는 과발현은 진단 또는 예후 검정법에서 대상체로부터의 생물학적 샘플(예컨대, 암 세포 또는 조직, 또는 종양 침윤 면역 세포로부터 유래된 샘플) 중의 FGFR의 증가된 수준을 평가함으로써 측정될 수 있다. 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 진단 또는 예후 검정법을 사용하여 (예컨대, 면역조직화학 검정법; IHC를 통해) 세포 표면 상에 존재하는 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 발현 수준을 평가할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 예컨대, 형광 계내 하이브리드화(FISH: fluorescent in situ hybridization; 1998년 10월 공개된 W098/45479 참조), 서던 블롯팅, 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction) 기술, 예컨대, 실시간 정량적 PCR(RT-PCR: real time quantitative PCR)을 통해 세포에서 FGFR 코딩 핵산의 수준을 측정할 수 있다(문헌 [Methods 132: 73-80 (1990)]). 상기 검정법 외에도, 다양한 생체내 검정법이 숙련자에게 이용가능하다. 예를 들어, 임의로, 검출가능한 표지, 예컨대, 방사성 동위원소로 표지된 항체에 환자 체내의 세포를 노출시킬 수 있고, 환자내 세포에 대한 항체의 결합은 예컨대, 방사능에 대한 외부 스캐닝에 의해, 또는 이전에 항체에 노출된 바 있는 환자로부터 채취된 생검을 분석함으로써 평가될 수 있다.

[0182] 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편의 치료 유효량은 예컨대, 예를 들어, 대상체의 체중, 연령, 과거 병력, 현재 약물, 건강 상태 및 교차 반응, 알레르기, 과민성 및 부작용의 가능성 뿐만 아니라, 투여 경로 및 질환 발병 정도와 같은 당업계에 공지된 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 투여량은 상기 및 다른 상황 또는 요건에 의해 지시되는 바와 같이 당업자(예컨대, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감량 또는 증량될 수 있다.

- [0183] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 치료 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 상기 실시양태 중 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 50 mg/kg 이하의 투여량으로 투여되고, 상기 실시양태 중 특정 실시양태에서, 투여량은 10 mg/kg 이하, 5 mg/kg 이하, 3 mg/kg 이하, 1 mg/kg 이하, 0.5 mg/kg 이하, 또는 0.1 mg/kg 이하이다. 특정 실시양태에서, 투여량은 치료 과정 동안 변경될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 초기 투여량은 후속 투여량보다 높을 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여량은 대상체의 반응에 따라 치료 과정 동안 변할 수 있다.
- [0184] 투여량 요법은 최적의 원하는 반응(예컨대, 치료 반응)을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 용량이 투여될 수 있거나, 또는 시간 경과에 따라 수회의 분할 용량이 투여될 수 있다.
- [0185] 본원에 개시된 항체는 예컨대, 예를 들어, 비경구(예컨대, 피하, 복강내, 정맥내(정맥내 주입 포함), 근육내 또는 진피내 주사) 또는 비경구(예컨대, 경구, 비내, 안내, 설하, 직장, 또는 국소) 경로와 같은, 당업계에 공지된 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0186] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 단독으로, 또는 하나 이상의 추가 치료 수단 또는 치료제와 함께 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 항체는 또 다른 치료제, 예를 들어, 화학요법제 또는 항암 약물과 함께 조합하여 투여될 수 있다.
- [0187] 상기 실시양태 중 특정 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제와 함께 조합하여 투여되는 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 추가 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 상기 실시양태 중 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편 및 추가 치료제(들)는 동일한 약학 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 함께 "조합하여" 투여되는 항체 또는 항원 결합 단편은 치료제와 동시에 또는 동일한 조성물로 투여될 필요는 없다. 항체 또는 항원 결합 단편 및 제2 작용제가 상이한 경로를 통해 투여되더라도, 또 다른 작용제 이전 또는 그 이후에 투여되는 항체 또는 항원 결합 단편은 본원에서 사용된 어구와 같이 상기 작용제와 함께 "조합하여" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우, 본원에 개시된 항체와 함께 조합하여 투여되는 추가 치료제는 추가 치료제의 제품 정보 시트에 열거된 스케줄에 따라, 또는 문헌 [Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))]에 따라, 또는 당업계에 널리 공지된 프로토콜에 따라 투여된다.
- [0188] 본 개시내용은 항FGFR2b 항체를 사용하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0189] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 샘플을 항체와 접촉시키는 단계, 및 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계를 포함하는, 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0190] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 제공된 항체와 접촉시키는 단계; b) 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계; c) FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을, 대상체에서의 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태의 존재 또는 상태와 연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 진단하는 방법을 제공한다.
- [0191] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 제공된 항체와 접촉시키는 단계; b) 샘플 중 FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을 측정하는 단계; c) FGFR2b 및/또는 FGFR1b의 존재 또는 양을, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 길항제에 대한 대상체의 잠재적 반응성과 연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태를 예측하는 방법을 제공한다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 임의로, 검출가능한 모이어티와 접합된, 본원에 제공된 항체를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 검출, 또는 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 진단에 유용할 수 있다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 FGFR2b 및/또는 FGFR1b 발현 조정이 도움이 되는 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약의 제조에서의, FGFR2b 및/또는 FGFR1b 관련된 질환 또는 병태 진단/예후를 위한 진단/예후 시약의 제조에서의 본원에 제공된 항체의 용도를 제공한다.
- [0194] 하기 실시예는 청구된 본 발명을 더 잘 설명하기 위해 제공되며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 하기에 기술되는 모든 특정 조성물, 물질 및 방법은 전체적으로 또는 부분적으로 본 발명의 범주 내에 포함된다. 상기 특정 조성물, 물질 및 방법은 본 발명을 제한하려는 것이 아니라, 단지 본 발명의 범주 내에 포함되는 구체적인 실시양태를 예시하기 위한 것이다. 당업자는 본 발명의 범주를 벗어나지 않고, 본 발명의

능력을 발휘하지 않고 등가의 조성물, 물질 및 방법을 개발할 수 있다. 본 발명의 범위 내에서 여전히 유지하면서, 본원에 기술된 방법에서 많은 변형이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기 변형이 본 발명의 범주 내에 포함되는 것이 본 발명자의 의도이다.

[0195] **실시예**

[0196] **실시예 1. 세포 및 시약**

[0197] FGFR2b를 발현하는 인간 위암 세포주 KATO III 및 SNU16, 및 Ba/F3 세포(프리-B 림프구)를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC: American Type Culture Collection)로부터 구입하였다. 상기 기술된 인간 세포주를 공급자의 권고에 따라 배양되었다. 인간 종양 조직은 규정에 따라 환자의 동의하에 중산 병원(Zhongshan hospital: 중국 소재)에서 입수하였고, 인간 폐암 환자 유래 이종이식 모델 LC038을 개발하는 데 사용하였다.

[0198] 항체 생성 기간 동안 항체 스크리닝을 위한 세포 기반 검정법을 확립하기 위해, Ba/F3 세포를 FGFR2b 또는 FGFR2c를 발현하도록 조작하였다. Ba/F3 세포를 인간 FGFR2의 2b 또는 2c 이소폼을 코딩하는 플라스미드로 형질 감염시켰다. G418을 사용하여 선별한 후, FGFR2b 또는 FGFR2c의 높은 발현을 보이는 단일 클론을 단리시켰다.

[0199] 인간 FGFR2b의 베타-이소폼(IgD2 및 IgD3 도메인)은 DNA 플라스미드 중 FGFR2b(진뱅크 수탁 번호 NP_001138391)의 세포외 도메인("ECD 도메인(Extra Cellular Domain)") 잔기 65-267을 인간 Fc 영역(잔기 100-330)에 융합시켜 면역부착 분자로서 발현시켰다. 인간 293F 세포(Invitrogen)를 형질감염시켜 단백질을 발현시키고, 단백질 A/G 칼럼을 사용하여 배양 배지로부터 정제하였다.

[0200] 시노몰구스 원숭이(cyno) FGFR2b ECD 도메인의 cDNA를 표준 기술에 의해 시노몰구스 피부 mRNA로부터의 클로닝하고, 아미노산 1-253을 뮤린 Fc에 융합하여 발현을 위한 시노몰구스 FGFR2b-Fc를 생성하였다. 뮤린 Fc에 융합된 인간(hu) FGFR2b(NP_001138391의 65-267) 또는 래트 FGFR2b(NP_001103363.1의 56-308)의 ECD 도메인 잔기 또한 발현되었다. 래트 및 마우스 FGFR2b ECD는 동일하다.

[0201] 재조합 FGFR1b-Fc, FGFR1c-Fc, FGFR2c-Fc, FGFR1c-Fc, FGFR3b-Fc, FGFR3c-Fc 및 FGFR4-Fc 단백질을 비롯한, 다른 인간 FGFR 패밀리 구성원의 인간 Fc 융합 단백질은 모두 R&D 시스템즈(R&D Systems)로부터 구입하였다. FGFR2b-Fc의 알파-이소폼, FGF 또한 R&D 시스템즈로부터 구입하였다. 헤파린은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(SIGMA, #H3149-500KU-9)로부터 입수하였다. PBMC는 올셀(A11Cell1)(#LP180322)로부터 구입하였다.

[0202] 임상 단계 항인간 FGFR2b 특이적 항체 FPA144는 관련 특허 출원 WO 2015/017600 A1에 따라 발현시켰다.

[0203] **실시예 2. 항FGFR 단일클론 Ab 생성**

[0204] Balb/c 마우스 또는 SJL 마우스를 50 μ g/마우스, 이어서, 25 μ g/마우스인 초기 용량, 또는 10 μ g/마우스, 이어서, 5 μ g/마우스인 초기 용량으로 CFA/IFA 중 인간 FGFR2b(베타)-Fc를 이용하여 i.p. 면역화시켰다. 인간 FGFR2b-Fc 또는 인간 FGFR2c-Fc에 대한 혈청 역가를 ELISA에 의해 측정하였다. 최종 주사 후 4일째, 슬와 림프양 세포를 추출하고, 마우스 골수종 세포와 융합시켰다. 융합 후 10일째, 하이브리도마 배양 상청액을 먼저 ELISA에 의해 NC-Fc(음성 대조군으로서 Fc 단편) 결합 대비로 FGFR2b(베타)-Fc 결합에 대해 스크리닝하였다. FGFR2b(베타)-Fc에는 결합하지만, NC-Fc에는 결합하지 않는 항체를 갖는 하이브리도마를 선택하였다. 1차 스크리닝을 통과한 하이브리도마를 FACS에 의한 BaF3/FGFR-2b 세포 및 BaF3/FGFR-2c에 대한 결합, FGF 리간드 결합의 차단 및 세포 사멸을 포함하는 2차 스크리닝 패널에 적용시켰다. 이러한 방식으로 Ab 26으로 명명된 클론을 포함하는 여러 양성 클론이 선택되었다. 이러한 선택된 클론에 의해 생산된 단일클론 항체의 이소타입은 이소타입 특이적 항체를 사용하여 결정되었다.

[0205] **실시예 3. 상이한 버전의 Ab 26 생성**

[0206] 표준 RACE 기술을 사용하여 Ab 26의 중쇄 및 경쇄 가변(VH, VL) 영역 서열을 결정하였다. 선택된 단일클론 하이브리도마 세포주로부터 총 RNA를 추출하였다. 이어서, 제조사의 설명서에 따라 SMART RACE cDNA 증폭 키트(SMART RACE cDNA Amplification Kit)(Clontech: 미국 캘리포니아주 팔로알토) 또는 진레이서(GeneRacer) 키트(Invitrogen)를 사용하여 5' 말단을 함유하는 전장의 제1 가닥 cDNA를 생성하고, PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 생성물을 단리시키고, 정제한 후, TA를 클로닝하고, 시퀀싱하였다.

[0207] 이어서, 마우스 Ab 26의 V_H 및 V_L을 인간 Fc에 이식함으로써 키메라 항체 Ab 26c를 생성하였다. Ab 26 및 Ab 26c(Ab 26의 키메라 버전)의 CDR 영역 서열 및 가변 영역 서열의 중쇄 또는 경쇄는 상기 기술된 표 1-3에 제시되어 있다.

[0208] 분자생물학의 표준 방법을 이용하여 Ab 26의 인간화를 디자인하고, 구성하고, 발현시킨다. 간략하면, 마우스 Ab 26의 CDR을 인간 수용자 프레임워크에 이식한다. 이어서, 컴퓨터 모델이 CDR과의 유의적인 접촉을 시사하는 프레임워크 위치에서 마우스 항체로부터의 아미노산 잔기를 인간 프레임워크 아미노산 잔기 대신으로 치환한다. 이를 통해 Ab hu26으로 명명되는, Ab 26의 인간화 버전을 수득한다. Ab hu26은 모체 마우스 또는 키메라 대응물과 비교하여 유사한 시험관내 또는 생체내 활성을 제공할 것으로 예상된다.

[0209] **실시예 4. Ab hu26의 비푸코실화 및 글리칸 분석**

[0210] Ab 26, Ab 26c 또는 Ab hu26의 비푸코실화된 단일클론 항체("Ab af26," "Ab af26c," 및 "Ab afhu26"으로 명명(여기서, 접두사 "af"가 "비푸코실화된"의 약칭이다))를 생성하기 위해, 1,6-푸코실트랜스퍼라제 녹아웃(FUT8^{-/-}) CHOK1 세포(Wuxi Biologics: 중국 상하이 소재)를 숙주 세포주로 사용하여 푸코스가 없는 항체(즉, 비푸코실화된 항체)를 생성한다. 우시 바이오로지스(Wuxi biologics)의 프로토콜에 따라 인간 IgG1 불변 Fc를 갖는 단일클론 Ab 26, Ab 26c, 또는 Ab hu26의 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 발현 벡터를 FUT8^{-/-} CHOK1에 일시적으로 형질감염시켜 비푸코실화된 항체를 생성한다.

[0211] 비푸코실화된 항체를 단백질 A 및 SEC-HPLC에 의해 정제하고, 투석하여 제제화 완충제로 교환하고, -80°C에서 보관한다. 정제된 비푸코실화된 항체의 글리칸을 LC-MS를 사용하여 분석한다. 각 피크의 질량을 측정하고, 이를 사용하여 각 글리칸을 확인하고, 결과는 각각의 비푸코실화된 항체가 거의 100% 비푸코실화된 항체라는 것을 입증한다.

[0212] **실시예 5. 항체의 결합 특징**

[0213] 인간 FGFR2b 또는 인간 FGFR1b 항원에 대한 항체의 결합을 표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 측정하였다. 간략하면, 먼저 50 mM N-하이드록시수신아미드(NHS): 200 mM EDC 도메인의 1:1 신선한 혼합물을 4 min 동안 주입하여 CM5 센서 칩(GE Healthcare Life Sciences)을 활성화시켰다. 이어서, hFGFR2b-Fc 또는 hFGFR1b-Fc를 아민 커플링 키트(Amine Coupling Kit)(GE Healthcare Life Sciences) 및 차단 시약으로서 1 M 에탄올아민을 사용하여 활성화된 CM5 센서 칩에 고정화시켰다. 약 20-30 반응 단위(RU: response unit, 1 RU는 1 mm²당 1 pg의 단백질 결합을 나타낸다)의 항원 단백질이 포획되었다.

[0214] HBS-EP+ 전개 완충제(GE Healthcare Life Sciences)(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20, pH 7.4) 중에 항체를 희석시키고, 연속 농도(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 nM)로 주입하고, 각 실행 사이클에 CM5 센서 칩의 표면 재생을 포함시켰다. 비아코어(Biacore) T200 평가 소프트웨어(버전 1.0)로 회합 상수, 해리 상수를 계산하였다. 도 1에 제시된 바와 같이, Ab 26c(키메라)는 인간 FGFR2b에 대해 강력한 결합 친화성을 나타내었고, 여기서, KD 값은 1.68 nM로, 이는 경쟁자 항체 FPA144와 유사하다. 추가로, Ab 26c는 FGFR1b 결합면에서 항체 FPA144와 구별된다. Ab 26c는 3.21 nM의 KD 값으로 인간 FGFR1b에 강력하게 결합하며, 이는 225 nM의 KD 값을 갖는 인간 FGFR1b에 대한 항체 FPA144의 매우 약한 결합과 비교된다. Ab 26c와 유사하게, Ab hu26은 또한 인간 FGFR1b에 대해 특이적인 결합을 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).

[0215] 선택된 항체가 세포막 상의 내인성 형태의 FGFR2b에 결합할 수 있는지 확인하기 위해, FGFR2b 발현 KATOIII 세포를 사용하여 유세포 분석법을 수행하였다. 10% 당나귀 혈청(Jackson Immunogen #017-000-121)이 포함된 PBS 완충제 중에서 모든 항체를 제조하였다. 500,000개의 KATOIII 세포를 4°C에서 60 min 동안 100 μl의, 상이한 농도의 항FGFR2b 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 2회 세척하고, 암실에서 4°C에서 30 min 동안 100 μl의, 10 μg/ml의 2차 IgG-알렉사488(IgG-Alexa488) 항체(Jackson Immunogen #709546149) 중에서 인큐베이션시켰다. 세포를 3회 세척하고, 세척 완충제로 재현탁시키고, 유세포 분석기에서 분석하였다. FACS 데이터 결과, 도 2에 제시된 바와 같이, Ab 26c는 KATOIII 세포에 강력하게 결합하고, 여기서, EC₅₀ 값은 약 3 nM인 것으로 분명하게 나타났다. Ab 26c와 유사하게, Ab hu26은 또한 KATOIII 세포에 대한 특이적인 결합을 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).

[0216] ELISA를 사용하여 Ab 26c의 재조합 cyno, 래트/마우스, 및 인간 FGFR2b-Fc 융합 단백질에 대한 교차 종 결합을 수행하였다. 간략하면, 96 웰 ELISA 플레이트를 밤새도록 PBS 중 약 100 μl/웰 0.1 μg/ml 재조합 인간 FGFR2b-Fc, 재조합 래트/마우스 FGFR2b-Fc, 또는 재조합 시노몰구스 FGFR2b-Fc 단백질로 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 0.05% 트윈20(Tween20)이 포함된 PBS 중 2% BSA로 차단하고, 항체 샘플과 함께 실온에서 60 min 동안 인큐베이션시킨 후, 이어서, 1XTBST(Cell Signaling Technology, #9997) 중에서 2회 세척한 후, 항인간 IgG HRP 접합체와 함께 실온에서 60 min 동안 인큐베이션시켰다. 테트라-메틸벤지딘 기질(Cell Signaling Technology, #7004)로 HRP 활성을 검출하였고, 정지액(Cell Signaling Technology, #7002)으로 반응을 정지시켰다. 플레이트

트는 450 nm에서 판독하였다. 도 3에 제시된 바와 같이, 상이한 종의 FGFR2b에 대한 Ab 26c의 결합 EC₅₀에 있어 유의적인 차이는 없다. Ab 26c의 래트/마우스 FGFR2b에 대한 결합 친화도가 가장 높고, 그 다음은 인간 FGFR2b 이고, 그 다음은 시노물구스 FGFR2b이다.

[0217] 유사하게, ELISA 검정법으로 다양한 FGFR 패밀리를 구성원, FGFR1b, FGFR3c, FGFR3b, FGFR4에 대한 Ab 26의 결합 특이성을 특징화하였다. 데이터는 도 4에 제시되어 있다. ELISA 분석 결과, Ab 26은 FGFR2b 및 FGFR1b에 특이적으로 결합하고, 이는 도 1에 제시된 데이터와 일치하며, 다른 FGFR 패밀리를 구성원에는 결합하지 않는다.

[0218] Ab 26 및 26c와 유사하게, ELISA 분석에서 Ab hu26은 또한 FGFR2b 및 FGFR1b에 대해 특이적인 결합을 나타내었지만, 임의의 다른 FGFR 패밀리를 구성원에 대해서는 결합을 보이지 않았다(데이터는 나타내지 않음).

[0219] **실시예 6. 시험관내 억제 활성**

[0220] FGFR2b 조작된 Ba/F3 세포 클론(Ba/F3-FGFR2b)에서 리간드 유도성 세포 증식에 대한 항체의 억제 활성을 수행하였다. 세포를 헤파린(10 µg/ml) 존재하에 10% 우태아 혈청 및 재조합 인간 FGF7 단백질(10 ng/mL)을 함유하는 RPMI1640 배지 중에 30,000개의 세포/웰로 96 웰 플레이트에 시딩하였다. 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 상이한 농도의 항FGFR2b 항체를 검정 플레이트에 첨가하고, 추가로 72시간 동안 인큐베이션시켰다. 72시간 동안 인큐베이션시킨 후, 20 µl의 셀타이터 아쿠어스 원 솔루션 리에이션트(CellTiter Aqueous One Solution Reagent)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 흡광도를 측정하기 위해, 각 웰에 25 µl의 10% SDS를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 테칸 스파크 20M(Tecan Spark 20M)에서 490 nm 및 650 nm(참조 파장)에서 흡광도를 측정하였다. Ab 26c는 약 10 nM의 GI₅₀으로 FGF7 유도성 BaF3 세포 증식을 강력하게 억제시킬 수 있다. 프리즘(Prism)을 사용하여 Ab 26c의 상기 억제 활성 데이터를 프로세싱하였고, 그래프를 도 5에 제시하였다. Ab 26c와 유사하게, Ab hu26은 또한 FGF7 유도성 BaF3 세포 증식의 강력한 억제를 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).

[0221] 항체에 의한 FGFR2 신호전달 경로의 억제를 조사하였다. SNU16 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지에서 성장시킨 후, 이어서, 30,000/웰로 시딩하고, 밤새도록 무혈청 RPMI/0.1% BSA 중에서 고갈시켰다. 이어서, 스크래핑하여 세포를 수집하고, 냉 PBS 중에서 1회 세척한 후, 이어서, 2XSDS 용해 완충제(100 mM 트리스 pH 6.8, 4% SDS, 20% 글리세롤 및 1X프로테아제 및 포스파타제 억제제(Pierce)) 중에서 용해시켰다. 이어서, 용해물을 100 °C에서 10 min 동안 비등시켰다. BCA 단백질 검정법 키트(Pierce)에 의해 단백질 농도를 검출하고, 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 이어서, i볼트(iBolt)(Invitrogen)를 이용하여 니트로셀룰로스 막으로 단백질을 옮긴 후, 이어서, FGFR2 및 그의 하류 유전자 ERK의 인산화에 대한 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다. 도 6에 제시된 바와 같이, Ab 26c 처리는 SNU16에서 용량에 의존하는 방식으로 인산화된 FGFR2 및 인산화된 ERK를 하향 조절한다. Ab 26c와 유사하게, Ab hu26은 또한 인산화된 FGFR2 및 인산화된 ERK의 하향조절을 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).

[0222] 항체의 ADCC 활성을 측정하는 시험관내 검정법을 수행하였다. 이펙터 세포로서 이지셉™ 인간 NK 세포 분리 키트(EasySep™ Human NK Cell Isolation Kit)(Stemcell, #17955)로부터 분리된 1차 NK 세포를 8:1의 이펙터 대 표적(E/T: effector to target) 세포 비로 사용하여 ADCC 검정법을 수행하였다. FACS 검정법 수행 전날 10% FBS+HEPES 10 mM+피루브산나트륨 1 mM을 함유하는 RPMI1640에서 인간 PBMC를 해동시켰다. 표적 세포 KATOIII을 세포 마커 CFSE-FITC(Invitrogen, # C34554)로 30분 동안 염색한 후, 이펙터 및 항체 존재하에 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 생존능 마커 바이어빌리티(Viability) 염료-APC-Cy7(BD, #565388)로 염색하였다. FACS에 의해 CFSE 염색 및 생존능 마커 염색 둘 모두에 대해 양성인 세포를 게이팅하여 세포독성 용해를 결정하였다. 데이터를 도 7에 제시하였다. Ab 26c는 77%의 최대 용해율(%) 및 0.034 µg/ml의 EC₅₀으로 강력한 ADCC 활성을 나타낸다. Ab hu26은 26c와 비교하여 유사한 ADCC 및 EC₅₀을 나타낸 반면, Afhu26은 26c와 비교하여 ADCC 및 EC₅₀을 유의적으로 개선시킨다. afhu26에 대해서도 또한 유사한 결과가 수득된다.

[0223] **실시예 7. 중앙 마우스 모델에서의 항체의 생체내 항종양 활성**

[0224] 면역결핍 누드 마우스를 비타리버(VitaRiver)로부터 구입하였다. 모든 동물 연구는 IACUC의 승인을 받았으며, 내부 및 지역 규제 요건에 따라 수행하였다.

[0225] LC038 인간 폐암 환자 유래 이종이식(PDX) 마우스 모델을 유사한 방식으로 확립하였다. 간략하면, 환자(F0)로부터 외과적으로 제거된 조직을 수술 후 2시간 이내에 면역손상된 누드 마우스(F1 마우스)에 피하로 이식하고, 이종이식 종양이 400-600 mm³ 크기에 도달하였을 때, 이를 절제하고, 단편으로 절단하고, F2, 및 후속 계대를 위해

누드 마우스에 이식하였다.

[0226] 캘리퍼스로 종양 결절을 2차원으로 측정하고, 종양 부피를 하기 공식을 사용하여 계산하였고: 종양 부피 = (길이 x 너비²) x 0.52, 종양 부피가 150-250 mm³에 도달했을 때, 종양 보유 마우스를 처리군로 무작위화하였다. 이어서, 마우스를 이소타입(즉, IgG1) 또는 시험된 물품(즉, FPA144, Ab 26c)로 무작위화 당일로부터 주 1회/2회 처리하였다. 마우스의 종양 부피와 체중을 매주 2회 측정하고, 원시 데이터를 기록하였다. 대조군과 처리군 사이의 종양 부피의 평균 변화를 비교함으로써 치료 시작부터 종양 성장 억제를 평가하였다. 계산은 각 군의 상대 종양 부피(RTV: relative tumor volume)의 기하 또는 산술 평균을 기반으로 하였다. RTV는 처리 당일의 종양 부피를 초기 종양 부피로 나누어 계산하였다.

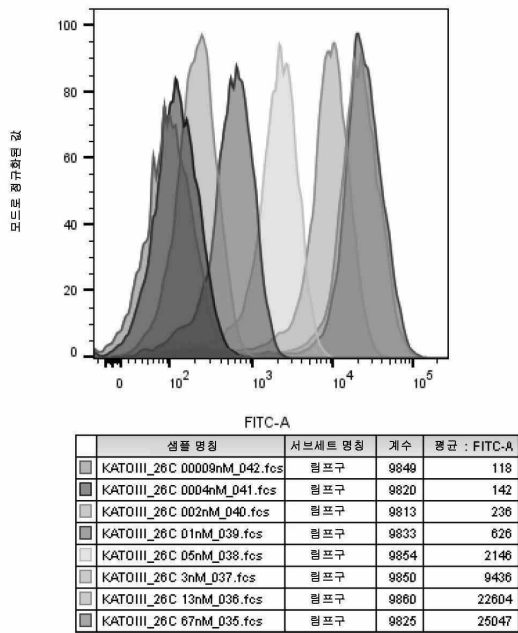
[0227] Ab 26c 또는 FPA144 처리된 LC038 PDX의 생체내 종양 성장 곡선을 도 8에 제시하였다. Ab 26c가 항체 FPA144 보다 더 우수한 항종양 활성을 보인다. Ab hu26 및 Ab af26, Ab af26c 및 Ab afhu26에 대해서도 또한 유사한 결과가 수득된다.

도면

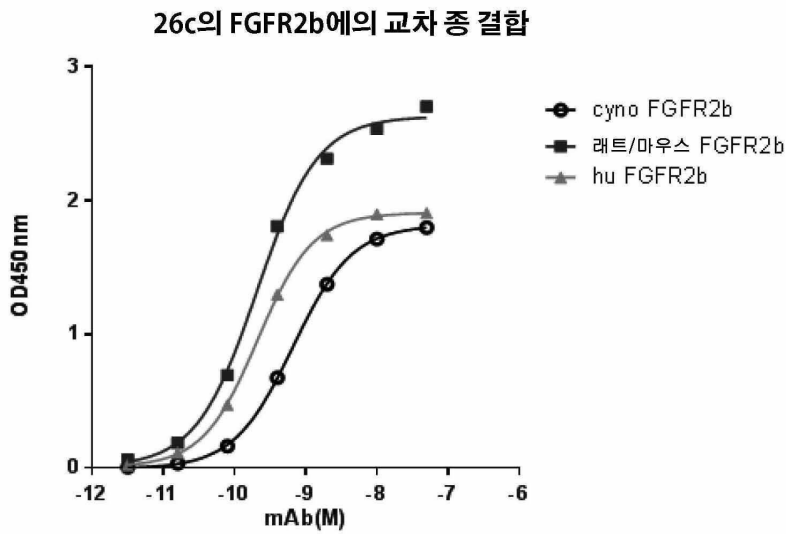
도면1

hFGFR2b			
Ab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FPA144	1.035E+05	7.766E-05	7.504E-10
26c	1.01E+05	1.70E-04	1.68E-09
hFGFR1b			
Ab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FPA144	3.32E+04	7.46E-03	2.25E-07
26c	1.72E+05	5.52E-04	3.21E-09

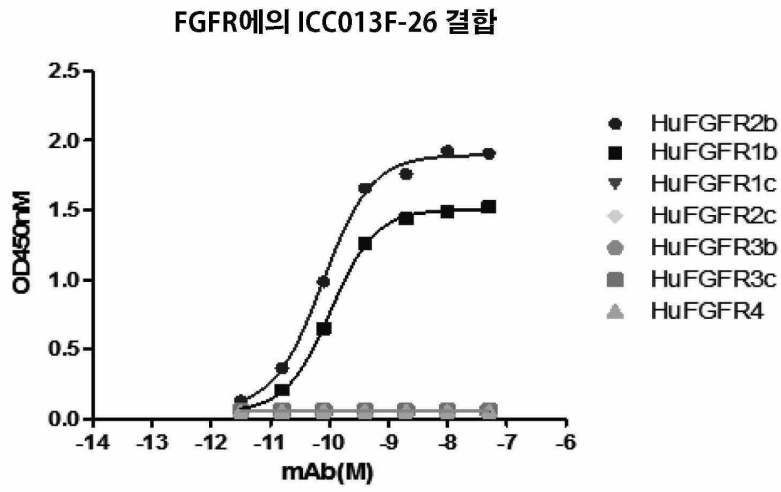
도면2



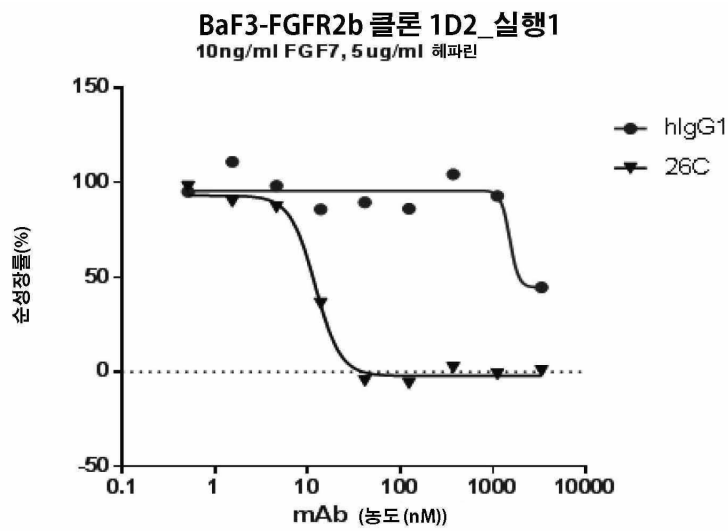
도면3



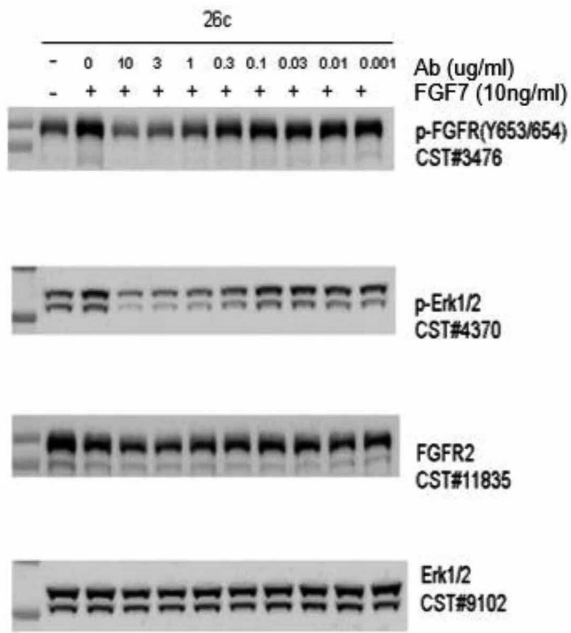
도면4



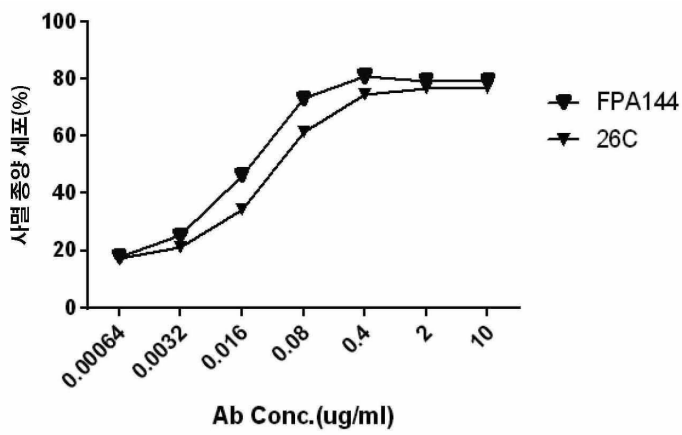
도면5



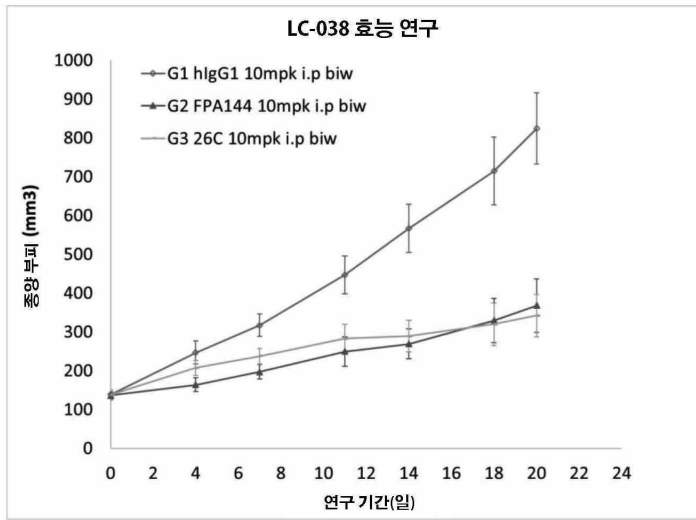
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dizal (Jiangsu) Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> NOVEL ANTI-FGFR2B ANTIBODIES

<130> 070542-8007W003

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> HCDR1

<222> (1)..(5)

<400> 1

Ser Gly Tyr Tyr Trp

1 5

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> LCDR1

<222> (1)..(11)

<400> 2

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> HCDR2

<222> (1)..(16)

<400> 3

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> LCDR2

<222> (1)..(7)

<400> 4

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> HCDR2

<222> (1)..(11)

<400> 5

Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<220><223> Ab26/26c ANTIBODIES HEAVY CHAIN VARIABLE REGION CODING SEQUENCE

<400> 8

gatgtacacc ttcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120

tttccaggga acaaactgga atggatgggc tacataacct acgatggtag caataactac 180

aacctatctc tcaaaaatcg actctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240

ctgcaattga gttctttgac aactgaggac acagccacat acttctgtgc aagagtttat 300

tactacgcta gtgggaactt cgatgtctgg ggcacagga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab26/26c ANTIBODIES LIGHT CHAIN VARIABLE REGION AMINO ACID

SEQUENCE

<400> 9

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Ile Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln Asp His Thr Ser Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab26/26c ANTIBODIES LIGHT CHAIN VARIABLE REGION CODING SEQUENCE

<400> 10

```
agtattgtga tgaccagac tccaaaaac ctgcttgat cagcaggaga cagggtacc      60
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca    120
gggcagtctc ctaaactgct gatatattat gcatctaate gctacactgg agtccctgat    180
cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcacattca ccatcagcac tgtgcaggct    240
gaagacctgg cagtttattt ctgtcaccag gatcatacct ctccattcac gttcggctcg    300
gggacaaaagt tggaaataaa a                                             321
```