(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월01일
(11) 등록번호 10-1590495
(24) 등록일자 2016년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7029136
(22) 출원일자(국제) 2009년05월28일
심사청구일자 2014년05월28일
(85) 번역문제출일자 2010년12월24일
(65) 공개번호 10-2011-0011710
(43) 공개일자 2011년02월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/045519
(87) 국제공개번호 WO 2009/148928
국제공개일자 2009년12월10일
(30) 우선권주장
61/057,183 2008년05월29일 미국(US)
61/170,561 2009년04월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20060240437 A1*
US20070036797 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
갤럭시 바이오테크, 엘엘씨
미국 캘리포니아 쿠퍼티노 샌 쥬언 로드 22830 (우:95014)
(72) 발명자
김, 경진
미국 95014 캘리포니아 쿠퍼티노 샌 쥬언 로드 22830
왕, 리홍
미국 94306 캘리포니아 팔로알토 벤츄라 애브뉴 #24 275
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

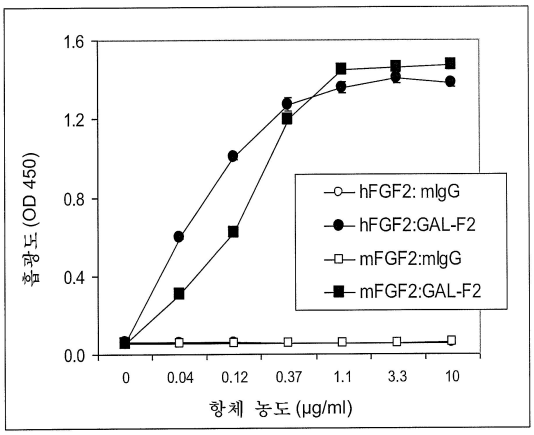
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **염기성 섬유모세포 성장 인자에 대한 모노클로날 항체**

(57) 요 약

본 발명은 염기성 섬유모세포 성장 인자에 대한 중화 모노클로날 항체, 이를 포함하는 약학적 조성물, 및 약학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

박, 한길

미국 94107 캘리포니아 샌프란시스코 해리슨 스트리트 #520 788

바스케즈, 막시밀리아노

미국 94303 캘리포니아 팔로알토 루이스 로드 3813

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 목록 번호:1의 서열 KASQSVSSDVG, SGSNRYS 및 QQDYYSPWT을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역(CDR) 및 서열 목록 번호:4의 서열 NYVIN, YNDPYNDVSKYNEKFKG 및 EGGGKYVYAMDS을 갖는 중쇄 CDR을 포함하는 모노클로날 항체(mAb).

청구항 2

제 1항에 있어서, 키메라 항체인 mAb.

청구항 3

제 1항에 있어서, 인간화된 항체인 mAb.

청구항 4

제 1항에 있어서, 하이브리도마 PTA-8864에 의해 생성된 mAb.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항에 있어서, Fab 또는 $F(ab')_2$ 단편 또는 단일 사슬 항체인 mAb.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제 3항에 있어서, 케이뱃 넘버링(Kabat numbering)에 의한 잔기 H1, H27, H30, H48, H67, H71 및 H94가 도 11B(GAL-F2)(서열 목록 번호:4)에 도시된 중쇄의 상응하는 위치를 점유하는 잔기에 의해 점유되는 mAb.

청구항 20

제 3항에 있어서, 경쇄 가변 영역 서열이 도 11A에 도시된 서열(HuGAL-F2)(서열 목록 번호:2)이고, 중쇄 가변 영역 서열이 도 11B(HuGAL-F2)(서열 목록 번호:5)에 도시된 서열인 mAb.

청구항 21

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서, 2008년 5월 29일에 출원된 미국 특허 출원 제 61/057,183호 및 2009년 4월 17일에 출원된 미국 특허 출원 61/170,561호를 우선권으로 주장하며, 상기 특허 출원은 전체 내용이 모든 목적상 본원에 포함된다.

[0003] **컴퓨터로 판독가능한 포맷으로 제출된 "서열목록", 표, 또는 컴퓨터 프로그램 목록에 대한 언급**

[0004] 파일 022382-000820US_SEQLIST.TXT로 작성된 서열목록은 12,406 바이트이며, 김경진 등(Kyung Jin Kim et al.)에 의해 "염기성 섬유모세포 성장 인자에 대한 모노클로날 항체"로 출원된 본 출원을 위해 2009년 5월 28일에 작성되었다. 본 파일에 함유된 정보는 참조로서 본원에 포함된다.

[0005] **미연방정부 후원하의 연구 또는 개발로 이루어진 발명의 권리에 대한 진술**

[0006] 본 출원에 기재된 성과는 미국국립보건원의 Grant 5R44 CA101283-03에 의해 일부 후원되었다. 미국 정부는 본 발명에 대해 일정한 권리를 갖는다.

[0007] **발명의 분야**

[0008] 본 발명은 일반적으로 신규한 생물학을 개발하기 위한 모노클로날 항체(mAb) 및 재조합 DNA 기술의 조합, 더욱 특히, 예를 들어, 염기성 섬유모세포 성장 인자에 결합하여 이를 중화시키는 모노클로날 항체의 생성에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0009] **발명의 배경**

[0010] 원형 섬유모세포 성장 인자(FGF), 산성 FGF(FGF1으로도 언급됨) 및 염기성 FGF(FGF2로도 언급됨)은 처음 1970년대에 분리되었다(FGF2 by Gospodarowicz et al., J. Biol. Chem. 250:2515, 1975). 현재 22개의 FGF 패밀리 일원이 공지되어 있고, 이는 활성 및 서열의 유사성을 기초로 하여 7개의 서브패밀리로 분류될 수 있다(Ornitz et al., Genome Biol. 2: 3005.1, 2001). 그러나, FGF 패밀리 일원은 조직 특이적 방식으로 발현되는 4개의 티로신 키나아제 수용체(FGFR1 4) 및 이의 이소형(isoform)에만 결합한다. FGF1 서브그룹은 FGF1 및 FGF2로 구성되고, 이들은 4개 모두의 FGFR에 결합하고, FGF2는 FGFR1c에 특히 강하게 결합한다(Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271:15292, 1996).

[0011] 인간 FGF2는 155개의 아미노산(aa) 전구체로부터 유래된, 성숙 형태에서 146개의 아미노산으로 구성되는 18 kDa의 당화되지 않은 폴리펩티드이다(Ornitz et al., Genome Biol. 2:3005.1, 2001; Okada-Ban et al., Int. J. Biochem. Cell. Biol. 32:263, 2000). 이러한 18 kDa 형태의 FGF2는 신호 서열을 엔코딩하지 않지만, ER-골지 복합체와 독립적인 비통상적 에너지 의존성 경로에 의해 분비될 수 있다(Mignatti et al., J. Cell Physiol. 151:81, 1992; Florkiewicz et al., J. Cell Physiol. 162:388, 1995). FGF2 유전자의 단일 카피는 또한 다양한 크기의 N-말단 신장을 제공하는 4개의 대안적 CUG 개시 부위를 이용함으로써 18 kDa 형태 외에 4개의 고분자량(HMW) 형태의 단백질을 엔코딩하여, 22 kDa(196 aa), 22.5 kDa(201 aa), 24 kDa(210 aa) 및 34 kDa(288 aa)의 단백질을 생성시킨다(Florkiewicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3978, 1989; Prats et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1836, 1989). HMW 형태는 분비되지 않지만, 세포핵으로 수송되고, 여기서 이들은 세포 성장을 조절할 수 있거나, 인트라크라인(intracrine) 방식으로 거동한다(Delrieu, FEBS Lett. 468:6, 2000).

[0012] 높은 친화성으로 FGFR1-4에 결합하는 것 외에, FGF2는 낮은 친화성으로 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(HSPG)에 결합한다. FGF2는 단량체로 분비되지만, 세포 표면 HSPG는 이후에 FGF 수용체를 이합체화시키고 이를 활성화시킬 수 있는 비공유적 사이드-투-사이드(side-to-side) 형태로 FGF2를 이합체화시킨다(Mohammadi et al., Cytokine Growth Factor Rev 16:107, 2005). FGFR의 세포외 도메인으로의 FGF 및 HSPG의 결합은 수용체 이합체화, 활성화 및 자가인산화를 유도한다.

[0013] FGF, 특히 FGF2는 다양한 세포 유형에 대해 광범위한 스펙트럼의 활성을 갖는다(Ornitz et al., Genome Biol. 2:3005.1, 2001). FGF2는 섬유모세포 및 내피 세포를 포함하는 특정 세포의 증식을 자극(즉, 상기 특정 세포에 대해 분열촉진성임)하고, 이는 신경 세포와 같은 특정 세포에 대해 생존 인자(항-아폽토틱(anti-apoptotic))이다(Okada-Ban, op. cit). 이는 또한 내피 세포의 분화(형태발생) 및 이동(운동)을 자극한다(Dow et al., Urology 55:800, 2000). FGF2는 특히 신경계의 발달과 관련된다. 중요하게는, FGF2는 강력한 혈관형성 인자이다(Presta et al., Cytokine and Growth Factor Rev. 16:159, 2005).

[0014] FGF2 및 다른 FGF는 혈관형성 및 종양 세포를 직접적으로 자극함으로써 암에서 일정한 역할을 하는 것으로 생각된다(Presta et al., op cit.). 종양 발달 동안, 암세포는 간질 세포(측분비)로부터 분비되는 세포외 FGF2에 반응할 수 있고, 이후 종양 세포 자신은 FGF2를 분비하고, 자가분비 방식으로 이에 반응할 수 있다. FGF2 또는 이의 수용체 FGFR1은 대부분의 신경아교종에서 발현되거나 과발현되는 것으로 밝혀졌다(Takahashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5710, 1990; Morrison et al. Cancer Res. 54:2794, 1994). FGF2는 전립선 종양의 발달과 관련이 있고(Dow et al., Urology 55:800, 2000), 이는 악성 흑색종의 증식의 중요한 매개체이다(Wang et al., Nature Med. 3:887, 1997). 종양 발달에서의 FGF2 또는 FGFR1의 과발현 및/또는 관련이 또한 타액선 종양(Myoken et al., J. Path. 178:429, 1996), 식도암(Barclay et al., Clin. Cancer Res. 11:7683, 2005), 및 갑상선 암종(Boelaert et al., J. Clin. Endocrin. Metabol. 88:2341, 2003)에 대해 보고되었다.

[0015] FGF2에 대한 폴리클로날 항체(항혈청)이 마우스에서 이식가능한 연골육종의 종양 성장을 억제하고(Baird et al., J. Cell Biochem. 30:79, 1986), 시험관내에서 FGF2의 다양한 활성을 중화시키고(Kurokawa et al., J. Biol. Chem. 264:7686, 1989), 국소적으로 적용되는 경우에 U87 신경아교종 세포 두개내 이종이식편의 성장을 억제(Stan et al., J. Neurosurg. 82:1044, 1995)하는 것이 보고되었다. 모노클로날 항체 중에서, DG2 mAb가 시험관내 및 생체내에서 FGF2의 활성을 중화시키고(Reilly et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 164:736, 1989; WO 91/06668), 누드 마우스에서 래트 C6 신경아교종 이종이식편의 성장을 적당히 억제하고(Gross et al., J. Nat. Cancer Inst. 85:121, 1993), i.p. 또는 i.v.가 아닌 병변내 전달되는 경우에 래트 연골육종의 성장을 적당히 억제(Coppola et al., Anticancer Res. 17:2033, 1997)하는 것으로 보고되었다. 유사하게, 항-FGF2 mAb DE6는 시험관내에서 신경아교종 세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다(Morrison et al., J. Neuroscience Res. 34:502, 1993). 반면에, 항-FGF2 mAbs bFM-1 및 bFM-2는 시험관내에서 내피 세포의 성장을 억제하나, 생체내에서 종양 혈관형성을 차단하지 않는 것으로 보고되었다(Matsuzaki et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 86:9911, 1989). 항-FGF2 mAb 1E6을 중화시키는 것은 RPMI4788 결장 종양 이종이식편의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다(Aonuma et al., 19:4039, 1999). 항-FGF2 mAb 254F1은 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)의 증식을 억제하는 것으로 보고되었고, mAb FB-8은 시험관내에서 비소세포폐암 세포주의 증식을 억제하는 것으로 보고되었다(Kuhn et al., Lung Cancer 44:167, 2004). 항-FGF2 mAb 3H3은 U87MG 및 T98G 신경아교종 및 HeLa 세포 이종이식편의 성장(Takahashi et al., FEBS Let. 288:65, 1991) 및 마우스에서 K1000 FGF2-트랜스펙션된 3T3 세포주의 성장(Hori et al., Cancer Res. 51 :6180, 1991)을 억제하는 것으로 보고되었다.

[0016] 본원에 기재된 GAL-F2 항-FGF2 mAb는 AACR 2009 연례 회의에서 포스터(Poster) #1236으로 논의되었고, 이는 모든 목적상 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

발명의 내용

[0017] **발명의 개요**

[0018] 한 구체예에서, 본 발명은 인간 염기성 섬유모세포 성장 인자(FGF2)에 대한 중화 mAb를 제공한다. mAb는 FGF2의 하나 이상, 바람직하게는 여러 또는 모든 생물학적 활성을 억제하는데, 이 억제에는 4개의 FGF 수용체 FGFR1-4 중 하나 이상으로의 결합; 섬유모세포, 내피 세포, Mv 1 Lu 밍크 폐 상피세포, 및/또는 다양한 인간 종양 세포의 증식 유도; 및 혈관형성의 유도가 포함된다. 항-FGF2 mAb는 단일 작용제로 사용되는 경우에 상기 활성을 억제할 수 있다. 바람직한 항-FGF2 mAb는 마우스에서 인간 종양 이종이식편의 성장을 억제한다. 바람직하게는, 본 발명의 mAb는 유전공학적으로 조작된, 예를 들어, 키메라, 인간화 또는 인간 mAb이다. 예시적 항체는 GAL-F2 및 이의 키메라 및 인간화 형태, 및 동일한 에피토프를 갖거나 결합에 대해 GAL-F2와 경쟁하는 mAb이다. 상기 항체를 생성하는 세포주가 또한 제공된다. 또 다른 구체예에서, 중화 항-FGF2 항체, 예를 들어, 키메라 또는 인간화 GAL-F2를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 세번째 구체예에서, 암 또는 다른 질병을 치료하기 위해 약학적 조성물이 환자에 투여된다.

[0019] **도면의 간단한 설명**

[0020] 도 1. 인간 FGF2(hFGF2) 및 마우스 FGF29(mFGF2)로의 GAL-F2 및 대조군 마우스 mAb(mIgG)의 결합 ELISA.

[0021] 도 2. 4개의 FGF 수용체 FGFR1-4의 각각에 대한, 대조군 마우스 mAb 5G8에서는 발생하지 않는, GAL-F2에 의한 억제를 나타내는 FGFR-Fc/FGF2-Flag 결합 ELISA.

[0022] 도 3. 인간 FGF2로의 비오티닐화된 GAL F2의 다양한 항-FGF2 mAb와의 경쟁적 결합 검정.

[0023] 도 4. GAL-F2 또는 대조군 mAb 5G8에 의한 FGFR1 또는 FGFR2로 안정적으로 트랜스펙션된 BaF3 세포의 FGF2-유도 증식의 억제. 없음(None)은 FGF2(또는 mAb)가 세포에 적용되지 않은 것을 의미한다.

[0024] 도 5. GAL-F2 또는 대조군 mAb 5G8에 의한 Mv 1 Lu 밍크 폐 상피세포의 FGF2-유도 증식의 억제. 없음은 FGF2(또는 mAb)가 세포에 적용되지 않은 것을 의미한다.

[0025] 도 6. 대조군 마우스 mAb(mIgG), GAL-F2 또는 bFM-1 항-FGF2 mAb의 존재하에서의 연성 아가에서 클로닝된 SMCC-7721 세포의 현미경사진.

[0026] 도 7. 종양 접종 5일 후로부터 시작한 GAL-F2(주당 100 μg 2회) 또는 PBS 단독으로 처리된 마우스에서의 RPMI 4788 인간 결장 종양 이종이식편의 성장.

[0027] 도 8. 종양 접종 6일 후로부터 시작한 GAL-F2 또는 bFM-1 항-FGF2 mAb(주당 100 μg 2회) 또는 PBS 단독으로 처리된 마우스에서의 RPMI 4788 인간 결장 종양 이종이식편의 성장.

[0028] 도 9. PBS 단독, GAL-F2(주당 100 μg 2회), 시스플라틴(주당 100 μg 1회), 또는 GAL-F2 및 시스플라틴 둘 모두로 처리된 마우스에서의 SMMC-7721 인간 간암 종양 이종이식편의 성장. 그룹당 5마리의 마우스.

[0029] 도 10. 접종 6일 후로부터 시작한 PBS 단독, GAL-F2 또는 M225 항-EGFR mAb(주당 100 μg 2회), 또는 GAL-F2 및 M225 둘 모두로 처리된 마우스에서의 HepG2 인간 간암 종양 이종이식편의 성장. 그룹당 6마리의 마우스.

[0030] 도 11A 및 11B. HuGAL-F2 경쇄(A)(서열 목록 번호:2) 및 중쇄(B) 성숙 가변 영역(서열 목록 번호:5)의 아미노산 서열이 마우스 GAL-F2(서열 목록 번호:1 및 4) 및 인간 수용자 V 영역(서열 목록 번호:3 및 6)과 정렬되어 도시된다. CDR이 GAL-F2 서열에서 밑줄로 표시되고, 마우스 L2G7 아미노산으로 치환된 아미노산이 HuGAL-F2 서열에서 이중 밑줄로 표시된다. 경쇄 및 중쇄 둘 모두에 대해 1글자 아미노산 코드 및 케이뱃(Kabat) 넘버링 시

스템이 사용된다.

[0031] 도 12. 본 명세서에 기재된 바와 같이 수행된, 인간화(HuGAL-F2) 및 키메라(ChGAL-F2) mAb 및 대조군 인간 항체 hIgG의 경쟁 결합.

[0032] 도 13. 전체 성숙 HuGAL-F2 항체 경쇄(A)(서열 목록 번호:7) 및 중쇄(B)(서열 목록 번호:8)의 아미노산 서열. 각각의 선의 첫번째 아미노산이 넘버링되고; 상기 넘버링이 연속된다. 경쇄에서, Cκ 영역의 첫번째 아미노산이 밑줄로 표시되고, 중쇄에서, CH1, 힌지(hinge), CH2 및 CH3 영역의 첫번째 아미노산이 밑줄로 표시된다.

[0033] **발명의 상세한 설명**

[0034] 본 발명은 중화 항-FGF2 모노클로날 항체, 이를 포함하는 약학적 조성물, 및 질병의 치료를 위해 상기 항체 및 조성물을 이용하는 방법을 제공한다.

[0035] 1. 항체

[0036] 항체는 복잡한 내부 구조를 지니는 매우 거대하고 복합적인 분자(~150,000 또는 약 1320개의 아미노산의 분자량)이다. 천연 항체 분자는 두개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬을 함유하고, 각각의 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 지닌다. 각각의 경쇄 및 중쇄는 차례로 두개의 영역으로 구성된다: 표적 항원의 결합과 관련된 가변("V") 영역, 및 면역계의 기타 성분과 상호작용하는 불변("C") 영역. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 함께 3차원 공간으로 회합되어 항원(예를 들어, 세포의 표면 상의 수용체)에 결합하는 가변 영역을 형성한다. 각각의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 내에는 상보성 결정 영역("CDR")으로 불리는 세개의 짧은 세그먼트(평균 10개의 아미노산 길이)가 존재한다. 항체 가변 도메인의 6개의 CDR(경쇄로부터 3개 및 중쇄로부터 3개)은 함께 3-D 공간으로 폴딩되어 표적 항원을 붙잡는 실제 항체 결합 부위를 형성한다. CDR의 위치 및 길이는 문헌[Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987]에 정확하게 규명되어 있다. CDR에 함유되지 않은 가변 영역의 부분은 CDR에 대한 환경을 형성하는 프레임워크로 언급된다. 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901, 1987]에는 구조에 의해 결정된 과가변 영역 또는 루프의 관련 개념이 규정되어 있다.

[0037] 인간화된 항체는 마우스 항체(래트, 햄스터 또는 다른 비-인간 종일수도 있는 "공여자 항체")로부터의 CDR이 인간 항체("수용자 항체")로 이식된 유전공학적으로 조작된 항체이다. 수용자 항체의 서열은, 예를 들어, 성숙 인간 항체 서열, 인간 항체 서열 또는 점라인(germline) 서열의 컨센서스(consensus) 서열일 수 있다. 따라서, 인간화된 항체는 공여자 항체로부터의 CDR, 및 인간 항체로부터의 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역을 갖는 항체이다. 또한, 높은 결합 친화성을 보유하기 위해, 2개의 추가 구조 성분 중 하나 이상이 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화된 항체의 제작에 대한 상세한 설명을 제공하는, 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제 5,530,101호 및 제 5,585,089호를 참조하라. 인간화된 항체는 통상적으로 인간화된 중쇄 및 인간화된 경쇄를 갖는다. 일반적으로, 인간화된 중쇄의 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 인간화된 경쇄의 경쇄 가변 영역 프레임워크 둘 모두는 수용자 인간 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 프레임워크(인간 컨센서스 가변 영역 프레임워크 및 복합 인간 가변 영역 프레임워크를 포함함)에 존재하지 않는 잔기를 발생시키는 10 또는 12개 이상의 치환을 포함하지 않는다.

[0038] 인간화된 항체는 종종 마우스 항체로부터의 6개 모두의 온전한 CDR(케이뱃에 의해 규정됨)을 포함하나, 이들은 또한 마우스 항체로부터의 완전하지 않는 CDR로 이루어질 수도 있다(참조: Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). 1개 또는 2개의 CDR이 결합에 대해 면제될 수 있는 다수의 항체가 과학 문헌에 기재되었다(Padlan et al., FASEB Journal 9: 133-139 (1995); Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428 (2002); Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, (1999); Tamura et al, Journal of Immunology, 164:1432-1441 (2000)). 유사하게, CDR의 일부분, 즉, SDR로 언급되는 결합에 필요한 CDR 잔기의 서브셋을 인간화된 항체에 통합시키는 것이 필요할 수 있다.

[0039] 기존의 연구를 기초로 하여 항원과 접촉하지 않고, SDR에 존재하지 않는 CDR 잔기(예를 들어, CDRH2 내의 잔기 H60-H65는 종종 필요하지 않음)가 분자 모델링 및/또는 경험에 의해, 또는 문헌[Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004]에 기재된 바와 같이 초티아(Chothia) 과가변 루프 외부에 놓인 케이뱃 CDR의 영역으로부터 확인될 수 있다. CDR 또는 이의 잔기(들)이 생략되는 경우, 이는 보통 가변 영역 프레임워크 서열을 채우는 인간 수용자 서열 내의 상응하는 위치를 점유하는 아미노산으로 치환된다. 포함되는 상기 치환의 수는 경쟁 고려사항의 균형을 반영한다. 이러한 치환은 인간화된 항체에서 마우스 아미노산의 수를 감소시키고, 그 결과로서 잠재적 면역원성을 감소시키는데 있어서 잠재적으로 유리하다. 그러나, 치환은 또한 친화성을 변화시킬

수 있고, 친화성의 유의한 감소는 회피되는 것이 바람직하다. CDR 내의 치환 및 치환되는 아미노산에 대한 위치는 또한 경험적으로 선택될 수 있다.

[0040] 인간화된 항체에서 높은 결합 친화성을 보유하기 위한 상기 언급된 첫번째 구조 요소에서, 인간화된 항체의 중쇄 가변 영역의 프레임워크는 다수의 공지된 인간 항체로부터 수용자 항체를 적절하게 선택함으로써 공여자 항체의 중쇄 가변 영역의 프레임워크와 최대 서열 동일성(65% 내지 95%)을 지니도록 선택된다. 두번째 구조 성분에서, 인간화된 항체의 제작에서 인간 수용자 항체의 프레임워크(CDR 외부)에서 선택된 아미노산은 특정된 규칙에 따라 공여자 항체로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된다. 특히, 프레임워크 내에서 대체되는 아미노산은 CDR과 상호작용하는 이들의 능력을 기초로 하여 선택된다. 예를 들어, 대체된 아미노산은 3-차원 공간에서 측정시 공여자 항체 서열 내의 CDR에 인접될 수 있거나 인간화된 항체 내의 CDR의 4-6 옹스트롬 내에 인접될 수 있다.

[0041] 키메라 항체는 마우스(또는 기타 설치류) 항체의 가변 영역이 인간 항체의 불변 영역과 조합된 항체이며; 유전공학에 의한 이들의 제작은 널리 공지되어 있다. 이러한 항체는 마우스 항체의 결합 특이성을 보유하며, 이의 약 2/3는 인간 항체이다. 마우스, 키메라 및 인간화된 항체에 존재하는 비인간 서열의 비율은 키메라 항체의 면역원성이 마우스 및 인간화된 항체 사이의 중간임을 암시한다. 마우스 항체에 비해 감소된 면역원성을 가질 수 있는 유전공학적으로 조작된 항체의 기타 유형은 파아지 디스플레이 방법(Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; 및 Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998, 이들 각각은 참조로서 본원에 포함됨) 또는 트랜스제닉 동물(Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741, 이들 각각은 참조로서 본원에 포함됨)을 이용하여 제조된 인간 항체를 포함한다.

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "인간-유사" 항체는 하나 또는 둘 모두의 사슬의 아미노산 서열의 많은 부분(예를 들어, 약 50% 또는 이 이상)이 인간 면역글로불린 유전자로부터 유래된 mAb를 의미한다. 그러므로, 인간-유사 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 사용되는 "감소된-면역원성"을 갖는 mAb는 인간 환자에 투여시 마우스 항체 보다 현저하게 적은 면역원성을 갖는 것으로 예상되는 것이다. 이러한 항체는 키메라 mAb, 인간화된 mAb 및 인간 mAb 뿐만 아니라 B-세포 에피토프 또는 T-세포 에피토프, 예를 들어, 노출되는 잔기에 기여할 수 있는 마우스 항체 내의 특정 아미노산을 대체함으로써 제조된 mAb를 포함한다(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). 본원에서 사용되는 "유전공학적으로 조작된" mAb는 유전자가 재조합 DNA 기술의 도움으로 제작되거나 비천연 환경(예를 들어, 마우스내 또는 박테리오파아지 상의 인간 유전자)에 놓여진 것이며, 따라서, 예를 들어, 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여 제조된 마우스 mAb를 포함하지 않는다.

[0043] mAb의 에피토프는 mAb가 결합하는 항원의 영역이다. 두개의 항체는 각각의 항체가 항원으로의 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제(차단)하는 경우 동일한 에피토프 또는 중첩(overlapping) 에피토프에 결합한다. 즉, 하나의 항체의 1x, 5x, 10x, 20x 또는 100x 과량은 경쟁 결합 검정으로 측정시 다른 항체의 결합을 50% 이상, 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%로 억제한다(참조: Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). 대안적으로, 두개의 항체는, 이들이 항원의 동일 영역에 결합하거나, 한 항체의 결합을 감소시키거나 배제시키는 항원 내의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항원의 결합을 감소시키거나 배제시키는 경우 동일한 에피토프를 갖는다. 두개의 항체는, 한 항체의 결합을 감소시키거나 배제시키는 몇몇 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 배제시키는 경우 중첩 에피토프를 갖는다.

[0044] 2. 중화 항-FGF2 항체

[0045] FGF2에 결합하는 모노클로날 항체(mAb)(즉, 항-FGF2 mAb)는, 이러한 결합이 FGF2의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제하는 경우(즉, mAb가 단일 작용제로 사용되는 경우) FGF2를 중화한다고 말하거나 FGF2가 중화된다고 언급된다. 중화 항체가 억제할 수 있는 FGF2의 생물학적 특성은, 예를 들어, 인간 혈관 내피세포(HUVEC) 증식 또는 관 형성의 자극 또는 병아리 배아융모요막(CAM)에 적용시 혈관의 유도에 의해 측정시 4개의 FGF 수용체 중 하나 이상에 결합하여, 섬유모세포, 내피 세포, Mv 1 Lu 밍크 폐 상피세포 및 다양한 인간 종양 세포를 포함하는 특정 세포의 증식을 자극(즉, 이에 대해 분열촉진성임)하고, 내피 세포와 같은 세포의 분화 및 이동을 자극하거나 혈관형성을 자극하는 FGF2의 능력이다.

[0046] 예를 들어, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 또는 50 μg/ml 농도의 본 발명의 중화 mAb는, 하기 실시예에 기술된 방법 또는 당 분야에 공지된 방법으로 측정시 FGF2의 생물학적 기능을 50% 이상, 바람직하게는 75%, 더욱 바람직하게는 90% 또는 95% 또는 심지어 99%, 가장 바람직하게는 약 100%(본질적으로 완전한 억제)로 억제한다. 통상적으로, 억제 정도는 사용되는 FGF2의 양이 단지 생물학적 활성을 완전히 자극하기에 충분하거나, 1, 2 또

는 5 ng/ml, 또는 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3 또는 10 μg/ml인 경우에 측정된다. 바람직하게는, mAb는 단일 작용제로 사용되는 경우에 생물학적 활성을 억제하는 중화 항체이지만, 임의로 억제를 발생시키기 위해 2개의 mAb가 함께 사용될 수 있다. 가장 바람직하게는, mAb는 상기 기술된 생물학적 활성 중 단지 1개가 아니라, 2개, 3개 또는 여러 활성을 중화시키는데; 본원에서의 목적상 FGF2의 모든 생물학적 활성을 중화시키는 단일 작용제로 사용되는 항-FGF2 mAb가 "완전 중화"로 언급되고, 이러한 mAb가 가장 바람직하다. 본 발명의 mAb는 바람직하게는 FGF2에 대해 특이적으로, 이들은 다른 FGF와 같은 FGF2와 관련된 단백질, 예를 들어, FGF1 및 혈관내피세포 성장인자(VEGF)에 결합하지 않거나, 훨씬 적은 정도(예를 들어, 10배 이상 적음)로 이에 결합한다. 본 발명의 일부 mAb는 인간 FGF2 및 마우스 FGF2 둘 모두에 결합하거나, 인간 FGF2, 및 마우스, 래트, 래빗, 닭, 개 및/또는 원숭이(예를 들어, 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이) FGF2 중 1개, 2개 이상 또는 모두에 결합한다. 다른 mAb는 인간 FGF2에 대해 특이적이다. 본 발명의 mAb는 통상적으로 10^{7} M^{-1}이상, 바람직하게는 10^{8} M^{-1} 또는 이 이상, 가장 바람직하게는 10^{9} M^{-1} 또는 이 이상, 또는 심지어 10^{10} M^{-1} 또는 이 이상의 FGF2에 대한 결합 친화성(Ka)을 갖는다.

[0047] 본 발명의 mAb는 천연 테트라머 형태(2개의 경쇄 및 2개의 중쇄)의 항-FGF2 항체를 포함하고, 이는 공지된 이소형 IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE, 및 이의 서브타입, 즉, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b, 및 IgG3 중 임의의 것일 수 있다. 본 발명의 mAb는 또한 항체의 단편, 예를 들어, Fv, Fab 및 F(ab')2; 이작용성 하이브리드 항체(참조: Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), 단일-사슬 항체(Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); 단일-암(arm) 항체(Nguyen et al., Cancer Gene Ther. 10:840, 2003); 및 변경된 불변 영역을 갖는 항체(참조: U.S. Patent No. 5,624,821)을 포함하는 것을 의미한다. mAb는 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터 또는 닭)에서 유래될 수 있거나, 이들은 유전공학적으로 조작될 수 있다. 설치류 mAb는, 예를 들어, 하기 실시예에 기술되는 바와 같이 적절한 애쥬번트 내에 FGF2를 복막내, 정맥내 또는 족저로 다수 면역화시킨 후, 비장 또는 림프절 세포를 적출하고, 적절한 무한증식 세포주와 융합시킨 후, FGF2에 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마에 대한 선택을 포함하는, 당 분야에 널리 공지된 표준 방법에 의해 제조된다. 상기 언급된 당 분야에 공지된 방법에 의해 제조된 키메라 및 인간화된 mAb가 본 발명의 바람직한 구체예이다. 예를 들어, 파아지 디스플레이 또는 트랜스제닉 마우스 방법에 의해 제조된 인간 항체가 또한 바람직하다(참조: Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, 상기).

[0048] 하기에 기재되는 중화 항-FGF2 mAb GAL-F2가 본 발명의 한 예이다. 중화 FGF2의 본원에 기재된 요망되는 특성을 갖는 단일한 원형(archetypal) 항-인간-FGF2 mAb, 예를 들어, GAL-F2가 분리된 후, 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 유사한 특성을 갖는 다른 mAb를 생성시키는 것은 간단하다. 예를 들어, 마우스는 상기 기재된 바와 같이 FGF2로 면역화되고, 하이브리도마가 생성되고, 생성된 mAb가 FGF2로의 결합에 대해 원형 mAb와 경쟁하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 마우스는 또한 GAL-F2가 결합하는 에피토프를 함유하는 FGF2의 보다 작은 단편으로 면역화될 수 있다. 에피토프는, 예를 들어, FGF2를 스패닝(spanning)하는 일련의 중첩 펩티드로의 결합에 대한 스크리닝에 의해 국소화될 수 있다. 대안적으로, 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Jespers et al., Biotechnology 12:899, 1994]의 방법이 동일한 에피토프를 가져, 이에 따라 원형 mAb, 예를 들어, GAL-F2와 유사한 특성을 갖는 mAb의 선택을 유도하는데 사용될 수 있다. 파아지 디스플레이를 이용하여, 먼저 원형 항체의 중쇄가 (바람직하게는, 인간) 경쇄의 레퍼토리와 페어링(pairing)되어 FGF2-결합 mAb가 선택된 후, 신규한 경쇄가 (바람직하게는, 인간) 중쇄의 레퍼토리와 페어링되어 원형 mAb와 동일한 에피토르를 갖는 (바람직하게는, 인간) FGF2-결합 mAb가 선택된다. 대안적으로, GAL-F2의 변이체는 하이브리도마로부터 수득된 GAL-F2의 중쇄 및 경쇄를 엔코딩하는 cDNA의 돌연변이유발에 의해 수득될 수 있다.

[0049] FGF2로의 결합에 대해 GAL-F2와 경쟁하는, 예를 들어, GAL-F2와 동일 또는 중첩 에피토프를 갖는 중화 mAb는 다른 예를 제공한다. GAL-F2의 키메라 또는 인간화 형태가 특히 바람직한 구체예이다. 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에서 GAL-F2와 90%, 95% 또는 99% 동일하고, 이의 기능적 특성을 유지하고/하거나, 적은 수의 기능적으로 중요하지 않은 아미노산 치환(예를 들어, 보존성 치환), 결실 또는 삽입에 의해 GAL-F2와 상이한 mAb가 또한 본 발명에 포함된다. GAL-F2의 상응하는 CDR과 90%, 95% 또는 99% 또는 100% 동일한 하나 이상, 바람직하게는 6개 모두의 CDR(들)을 갖는 mAb가 또한 포함된다. 본원에서, 본 출원의 다른 곳에서, 케이뱃 넘버링 규칙에 의해 최대로 정렬된 항체 서열을 이용하여 서열 동일성 백분율이 결정된다. 정렬 후, 주제 항체 영역(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 전체 성숙 가변 영역)이 참조 항체의 동일 영역과 비교되며, 주제 항체 영역과 참조 항체 영역 사이의 서열 동일성 백분율은 주제 및 참조 항체 영역의 정렬된 위치의 전체 수로 나누어지고(갭은 계수되지 않음), 100을 곱하여 백분율로 전환된, 주제 및 참조 항체 영역 둘 모두에서 동일한 아미

노산에 의해 점유된 위치의 수이다.

[0050] 본 발명의 천연 mAb는 이의 하이브리도마로부터 생성될 수 있다. 유전공학적으로 조작된 mAb, 예를 들어, 키메라 또는 인간화된 mAb는 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 발현될 수 있다. 예를 들어, 이들의 경쇄 및 중쇄 V 영역을 엔코딩하는 유전자는 중첩 올리고누클레오티드로부터 합성되고, 이용가능한 C 영역과 함께 필수 조절 영역, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 폴리 A 부위 등을 제공하는 발현 벡터(예를 들어, 인비트로젠(Invitrogen)사에서 시판됨)로 삽입될 수 있다. CMV 프로모터-인핸서의 사용이 바람직하다. 이후, 발현 벡터는 다양한 널리 공지된 방법, 예를 들어, 리포펙션(lipofection) 또는 전기천공을 이용하여 다양한 포유동물 세포주, 예를 들어, CHO 또는 Sp2/0 및 NS0를 포함하는 비생성 골수종, 및 적절한 항생제 선택에 의해 선택된 항체 발현 세포로 트랜스펙션될 수 있다. 미국 특허 제 5,530,101호를 참조하라. 세포를 시판되는 바이오리액터에서 성장시킴으로써 보다 많은 양의 항체가 생성될 수 있다.

[0051] 발현된 후, 본 발명의 mAb 또는 기타 항체는 당 분야의 표준 공정, 예를 들어, 미세여과, 초여과, 단백질 A 또는 G 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및/또는 유기 염료 등에 기초한 기타 형태의 친화성 크로마토그래피에 따라 정제될 수 있다. 약학적 용도를 위해 약 90 또는 95% 이상의 균질성의 실질적으로 순수한 항체가 바람직하고, 98% 또는 99% 또는 이 이상의 균질성이 가장 바람직하다.

[0052] 3. 치료 방법

[0053] 본 발명은, 본 발명의 mAb(예를 들어, 항-FGF2)가 질병을 갖거나(치료적 치료) 질병의 발생 또는 재발 위험이 있는(예방적 치료) 환자에 투여되는 치료 방법을 제공한다. 용어 "환자"는 인간 환자; 가축 환자, 예를 들어, 고양이, 개 및 말; 농장 동물, 예를 들어, 소, 양 및 돼지; 및 시험 목적을 위해 사용되는 실험실 동물, 예를 들어, 마우스 및 래트를 포함한다. 상기 방법은 인간 환자의 치료에 특히 적용된다. 인간 환자를 치료하는 방법에 사용되는 mAb는 인간 FGF2 단백질에 결합하고, 이의 서열은, 예를 들어, 문헌[Ornitz et al., Genome Biol. 2: 3005.1, 2001 or Okada-Ban et al., Int. J. Biochem. Cell. Biol. 32:263, 2000], 및 또한 스위스-프롯(Swiss-Prot) 데이터베이스의 로커스(Locus) P09038에 의해 제공된다. 인간 단백질에 대한 mAb는 또한 다른 종에서 사용될 수 있고, 상기 종 동족체는 인간 단백질과의 항원성 교차반응을 갖는다. 상기 교차반응성이 결핍된 종에서, 상기 종에 존재하는 종 동족체에 대한 적절한 특이성을 갖는 항체가 사용된다. 그러나, 실험실 동물에서의 이종이식편 실험에서, 이종이식편에 의해 발현된 인간 단백질에 대한 특이성을 갖는 mAb가 일반적으로 사용된다.

[0054] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체를 포함하는 약학적 제형을 제공한다. 항체의 약학적 제형은 동결건조되거나 수용액의 형태의, 임의로 부형제 또는 안정제를 지니는 생리학적으로 허용되는 담체 중에 mAb를 함유한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 이는 통상적으로 5.0 내지 8.0, 가장 흔하게는 6.0 내지 7.0의 pH의 포스페이트, 시트레이트 또는 아세테이트와 같은 완충제; 염화나트륨, 염화칼륨 및 등장성을 만들기 위한 기타 염과 같은 염; 항산화제, 보존제, 저분자량 폴리펩티드, 단백질, 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리소르베이트 80, 아미노산, 탄수화물, 킬레이트제, 당, 및 당업자에게 공지된 기타 표준 성분을 포함한다(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). mAb는 통상적으로 1-100 mg/ml, 예를 들어, 10 mg/ml의 농도로 존재한다.

[0055] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 약학적 제형 중의 항-FGF2 mAb를 이용하여 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 약학적 제형으로 제조된 mAb는 임의의 적합한 경로, 특히 정맥내 주입 또는 볼루스 주사에 의한 비경구 경로, 근내 또는 피하 경로에 의해 환자에 투여될 수 있다. 정맥내 주입은 15분 만큼 적은 기간에 걸쳐 제공될 수 있으나, 보다 흔하게는 30분, 또는 1, 2 또는 3시간에 걸쳐 제공될 수 있다. mAb는 또한 질병 부위(예를 들어, 종양)로 직접 주사될 수 있거나, 리포솜과 같은 운반제(carrying agent)로 캡슐화될 수 있다. 제공된 용량은 치료되는 질환을 완화시키기에 적어도 부분적으로 충분하며("치료적 유효량"), 이는 임의로 체중 kg당 0.1 내지 5 mg, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 mg/kg이나, 10 mg/kg 또는 심지어 15, 20 또는 30 mg/kg 만큼 많을 수 있다. 고정된 단위 용량, 예를 들어, 100, 200, 500, 1000 또는 2000 mg이 제공될 수 있거나, 용량은 환자의 표면적, 예를 들어, 1000 mg/m^2을 기초로 할 수 있다. 보통, 1 내지 8회 용량(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8회)이 암을 치료하기 위해 투여되나, 10, 20회 또는 이 이상의 용량이 제공될 수 있다. mAb는, 예를 들어, mAb의 반감기에 따라 1주, 2주, 4주, 8주, 3-6개월 또는 이 이상 또는 질병이 발달할때까지 매일, 1주일에 2회, 매주, 격주, 매월 또는 몇몇 다른 간격으로 투여될 수 있다. 반복 과정의 치료가 또한 가능하며, 이는 만성 투여이다.

[0056] 치료되는 환자에 존재하는 질병을 적어도 부분적으로 완화시키는데 유용한 용량, 투여 빈도 및 투여 경로의 조합이 치료적으로 유효한 요법으로 언급된다. 환자에서 질병의 발생을 억제하거나 지연시키는데 유요한 용량, 투여 빈도 및 투여 경로의 조합이 예방적으로 유용한 요법으로 언급된다.

[0057] 본 발명의 항-FGF2 mAb를 이용한 치료에 특히 민감한 질병은 혈관형성을 필요로 하거나, FGF2의 상승된 수준과 관련되거나, FGF2의 발현과 관련된 것으로 생각되는 고형 종양을 포함한다. 항-FGF2 mAb를 이용한 치료가 적합한 상기 종양은, 예를 들어, 난소암, 유방암, 폐암(소세포 또는 비소세포), 결장암, 전립선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 췌장암, 위암, 간세포 암종 또는 간세포암(간암), 두경부 종양, 흑색종, 육종, 암종 및 뇌종양(예를 들어, 신경아교종, 예를 들어, 교모세포종)을 포함한다. 혈액암, 예를 들어, 백혈병 및 림프종 및 다발골수종이 또한 상기 치료에 민감할 수 있다. 본 발명의 항-FGF mAb를 이용한 치료가 적합한 혈관형성과 관련된 다른 질병은 연령 관련 황반 변성(AMD), 당뇨망막병증, 신생혈관 녹내장 및 안구의 다른 질병; 건선 및 피부의 다른 질병; 및 류마티스 관절염을 포함한다.

[0058] 한 바람직한 구체예에서, 항-FGF2 mAb는 다른 요법과 함께(즉, 다른 요법과 함께, 즉 다른 요법 전, 다른 요법 동안 또는 다른 요법 후) 투여된다. 예를 들어, 암을 치료하기 위해, 항-FGF2 mAb는 공지된 화학요법 약물, 예를 들어, 알킬화제, 예를 들어, 카르무스틴(carmustine), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 프로카르바진(procarbazine), 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide); 항대사물질, 예를 들어, 플루오로우라실(fluorouracil), 플록스우리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 젬시타빈(gemcitabine), 메토트렉세이트(methotrexate) 및 히드록시우레아(hydroxyurea); 천연 생성물, 예를 들어, 식물 알칼로이드 및 항생제, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 에토포시드(etoposide), 미토마이신(mitomycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 및 탁솔(Taxol)(파클리탁셀(paclitaxel)) 또는 관련 화합물, 예를 들어, 탁소테레®(Taxotere®); 토포이소머라아제 1 억제제 이리노테칸(irinotecan); 뇌종양에 대해 특별하게 승인된 작용제, 예를 들어, 테모졸로미드(temozolomide) 및 카르무스틴(carmustine)을 함유하는 글리아델® 웨이퍼(Gliadel® wafer); 및 티로신 키나아제의 억제제, 예를 들어, 글리벡®(Gleevec®)(이마티니브 메실레이트(imatinib mesylate)), 수텐트®(Sutent®)(수니티니브 말레이트(sunitinib malate)), 넥사바르®(Nexavar®)(소라페니브(sorafenib)), 타르세바®(Tarceva®)(에를로티니브(erlotinib)) 및 이레싸®(Iressa®)(제피티니브(gefitinib)); 혈관형성의 억제제; 및 WO 2005/017107 A2호(참조로서 본원에 포함됨)에 나열된 모든 승인된 실험 항암 작용제 중 어느 하나 이상과 함께 투여될 수 있다. 항-FGF2 mAb는 표준 화학요법에서 사용되는 상기 다른 작용제 중 1, 2, 3개 또는 이 이상과 함께 사용될 수 있다. 일반적으로, 다른 작용제는 치료되는 특정 유형의 암에 대해 효과적인 것으로 이미 공지된 것이다. 항-FGF2 mAb는 화학요법 약물에 대한 내성을 극복하여, 이에 따라 효과를 증가시키는데 특히 유용하다(참조: Song et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 97:8658, 2000).

[0059] 항-FGF2 mAb와 함께 암을 치료하기 위해 투여될 수 있는 다른 작용제는 HER2 항원에 대한 허셉틴™(Herceptin™); VEGF에 대한 아바스틴®(Avastin®); 또는 상피 성장 인자(EGF) 수용체에 대한 항체, 예를 들어, 에르비툭스®(Erbitux®)(세툭시맙(cetuximab)) 및 벡티빅스®(Vectibix®)(파니투무맙(panitumumab))을 포함하는 모노클로날 항체와 같은 생물학제를 포함한다. 간세포 성장 인자(HGF)에 대한 항체가 mAb L2G7(Kim et al., Clin Cancer Res 12:1292, 2006 및 US Patent No. 7,220,410) 및 특히 이의 키메라 및 인간화된 형태, 예를 들어, HuL2G7(WO 07115049 A2); WO 2005/017107 A2호, 특히 2.12.1에 기재된 인간 항-HGF mAb; 및 WO 07143090 A2호 또는 WO 07143098 A2호에 기재된 HGF 결합 단백질; 및 결합에 대해 상기 언급된 mAb 중 임의의 것과 경쟁하는 다른 중화 항-HGF mAb를 포함하는 항-FGF2 mAb와 함께 사용하기에 특히 바람직하다. HGF의 cMet 수용체에 결합하는 mAb, 예를 들어, 단지 하나의 "암(arm)", 즉, 결합 도메인을 갖도록 유전공학적으로 조작된 항-cMet mAb OA-5D5(Martens et al., Clin. Cancer Res. 12:6144, 2006)가 또한 바람직하다. 또한, 항 FGF2 mAb가 수술 및/또는 방사선 요법, 예를 들어, 외부 빔 방사선요법, 강도 변조 방사선 요법(IMRT)의 임의의 형태, 및 방사선수술의 임의의 형태, 예를 들어, 감마 나이프(Gamma Knife)와 함께 사용될 수 있다.

[0060] 항-FGF2 mAb 항체를 포함하는 치료(예를 들어, 표준 화학요법)는 항-FGF2 mAb를 이용하지 않은 동일 치료(예를 들어, 화학요법)에 비해 암을 가진 환자의 중앙 무진행 생존 기간(median progression-free survival time) 또는 전체 생존 기간을 30% 또는 40% 이상, 바람직하게는 50%, 60% 내지 70% 또는 심지어 100% 또는 이 이상 증가시킴으로써 질병을 완화시킬 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항-FGF2 mAb를 포함하는 치료(예를 들어, 표준 화학요법)는 항-FGF2 mAb를 이용하지 않은 동일 치료(예를 들어, 화학요법)에 비해 상기 종양(예를 들어, 특히

재발되거나 난치성인 난소암, 유방암, 폐암, 결장암 및 교모세포종)을 가진 환자의 완전반응률, 부분반응률 또는 객관적 반응률(완전 + 부분)을 30% 또는 40% 이상, 바람직하게는 50%, 60% 내지 70% 또는 심지어 100% 증가시킬 수 있다.

[0061] 통상적으로, 임상 시험(예를 들어, Ⅱ 상, Ⅱ/Ⅲ 상 또는 Ⅲ 상 시험)에서, 화학요법(또는 위약 첨가)만 받은 대조군의 환자에 비해 화학요법과 함께 항-FGF2 mAb로 처리된 환자의 중앙 무진행 생존 및/또는 반응률에서의 상기 언급된 증가는, 예를 들어, p = 0.05 또는 0.01 또는 심지어 0.001 수준으로 통계적으로 유의하다. 완전반응률 및 부분반응률은, 예를 들어, 국립 암 연구소 및/또는 식품의약국에 의해 제시되거나 승인된 암에 대한 임상 시험에서 통상적으로 사용되는 객관적 기준에 의해 결정된다.

[0062] 4. 기타 방법

[0063] 본 발명의 항-FGF2 mAb는 또한 진단, 예후 및 실험실 방법에 사용된다. 이는 FGF2의 수준이 측정가능하거나 심지어 상승되는지 결정하여, 이에 따라 종양의 치료를 추구하고 인도하기 위해 종양 또는 암을 가진 환자의 혈액에서 FGF2의 수준을 측정하는데 사용되며, 이는 측정가능하거나 상승된 수준의 FGF2와 관련된 종양이 항-FGF2 mAb를 이용한 치료에 가장 민감할 것이기 때문이다. 예를 들어, 높은 수준의 FGF2와 관련된 종양은 항-FGF2 mAb를 이용한 치료에 특히 민감할 것이다. 특정 구체예에서, mAb는, 예를 들어, 종양 생검 표본, 또는 혈청, 또는 세포 배양물의 FGF2-분비 세포의 배지 상층액에서 FGF2의 수준을 측정하기 위해 ELISA 또는 방사선면역측정법에서 사용될 수 있다. 다양한 에피토프에 결합(즉, 결합에 대해 경쟁하지 않음)하는 2개의 항-FGF2 mAb의 사용이 FGF2를 검출하기 위한 민감한 "샌드위치" ELISA 개발에 특히 유용할 것이다. 다양한 검정에 대해, mAb는 형광 분자, 스핀-라벨링된 분자, 효소 또는 방사성 동위원소로 라벨링될 수 있고, FGF2에 대한 검정을 수행하기 위해 모든 필요한 시약을 갖는 키트의 형태로 제공될 수 있다. 다른 용도에서, 항-FGF2 mAb는, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피에 의해 FGF2를 정제하는데 사용될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] **실시예**

[0065] 실시예 1: 시약 및 검정

[0066] GST-FGF2, FGF2-Fc 및 FGF2-Flag의 제조. 인간 FGF2에 대한 cDNA 서열(155개의 아미노산을 갖는 전구체 형태; Sommer et al., 1987)을 합성하고(GenScript, Inc), PCR 증폭시키고, pDisplay 벡터(Invitrogen)의 유도체에 클로닝시켰다. 이러한 플라스미드로 E. 콜리(E. coli) BL21(DE3) 세포를 형질전환시키고, 1 mM IPTG를 이용하여 FGF2 발현을 유도하였다. FGF2 발현의 수준을 FGF2 특이적 ELISA 키트(R&D Systems)를 이용하여 결정하고, FGF2를 문헌[Wiedlocha et al., Mol. Cell Biol. 16:270, 1996]에 기재된 바와 같이 헤파린-세파로오스 CL-6B 비드(Amersham Biosciences)를 이용하여 정제하였다. FGF2/FGFR 결합 검정 뿐만 아니라 면역화에 사용되는, FGF2와 글루타민 합성효소(GST-FGF2), Flag 펩티드(FGF2-Flag), 및 인간 IgG1 Fc 도메인(아미노산 216 내지 446; FGF2-Fc) 각각의 융합 단백질을 표준 분자생물학 기술을 이용하여 적절한 유전적 제작으로부터 유사하게 생성시켰다. GST-FGF2를 항-GST 컬럼을 이용하여 정제하고, FGF2-Fc를 단백질 A/G 컬럼을 이용하여 정제하고, FGF-Flag를 FGF2-Flag 농도의 결정 후에 배양 상층액에서 사용하였다. 또한, 정제된 인간 FGF2(QED Bioscience Inc.) 및 뮤린 FGF2(ProSpec-Tany Technogene Ltd.)를 구입하였다.

[0067] FGFR-Fc 단백질의 제조. 인간 FGFR1 알파(IIIc)(FGFR1c로 명명됨) 및 인간 FGFR2C 알파(IIIc)(FGFR2c로 명명됨)의 세포외 도메인(ECD)을 면역부착소(immunoadhesin) 분자로 발현시켰다. FGFR1c 및 FGFR2c의 전체 ECD를 엔코딩하는 DNA 단편을 폴리펩티드 링커를 통해 인간 Fc에 융합시켰다. 이러한 FGFR-Fc 분자를 293 발현 배지(Invitrogen)에서 G418(1 mg/ml)의 존재하에서 인간 293F 세포를 트랜스펙션시키고, 안정적인 293 트랜스펙턴트(transfectant)를 선택함으로써 발현시켰다. 293F 트랜스펙션된 세포로부터 분비된 FGFR-Fc를 단백질 A/G 컬럼을 이용하여 정제시켰다. 또한, 인간 FGFR3c-Fc 및 인간 FGFR4-Fc 융합체를 R & D 시스템즈(R & D Systems)로부터 입수하였다.

[0068] FGF2 단편의 합성. FGF2의 아미노산 잔기 29-44(펩티드 #1), 101-118(펩티드 #3) 및 137-155(펩티드 #4)로 구성된 펩티드를 SynBioSci에 의해 합성시켰다. 여분의 시스테인 잔기를 펩티드 #1 및 #3의 C-말단 및 펩티드 #4의 N-말단에 첨가하였다. 이후, 이러한 펩티드 단편을 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 컨쥬게이션시켰다.

[0069] FGF2 결합 ELISA. ELISA 웰을 4℃에서 밤새 50 μg/ml의 헤파린(Sigma)으로 코팅시킨 후, 실온(RT)에서 1시간 동안 0.3-1 μg/ml의 인간 또는 마우스 FGF2와 함께 인큐베이션시켜, 헤파린이 FGF2를 포획할 수 있도록

하였다. 실온에서 1시간 동안 2% BSA로 블로킹시킨 후, 하이브리도마 배양 상층액 또는 정제된 mAb를 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 결합된 항-FGF2 항체를 실온에서 1시간 동안 HRP-염소 항-마우스 IgG Fc의 첨가한 후, 세척하고, TMB 기질(Sigma)을 첨가하고, 450 nm에서 판독하여 검출하였다.

[0070] FGFR-Fc/FGF2-Flag 결합 ELISA. 항-FGF2 mAb의 블로킹 활성을 FGFR-Fc/FGF2-Flag 결합 ELISA에서 결정하였다. ELISA 웰을 4℃에서 밤새 인간 IgG-Fc에 특이적인 2 μg/ml의 염소 항체로 코팅하였다. 실온에서 1시간 동안 2% BSA로 블로킹시킨 후, 웰을 1시간 동안 0.5 μg/ml의 FGFR1c-Fc, FGFR2c-Fc, FGFR3c-Fc 또는 FGFR4-Fc와 함께 인큐베이션시켰다. 세척 후, 웰을 1시간 동안 다양한 농도의 mAb의 존재하에서 FGF2-Flag(0.2 μg/ml)와 함께 인큐베이션시켰다. HRP-항-Flag M2 항체(Sigma)의 첨가에 의해 결합된 FGF2-Flag를 검출하였다.

[0071] 실시예 2: 모노클로날 항체의 생성

[0072] Balb/c 마우스(5-6 주령 암컷)를 하기 표에 기재된 바와 같이 MPL/TDM(Sigma-Aldrich)에 현탁된 GST-FGF2, FGF2-Fc 및/또는 KLH 컨쥬게이션된 FGF2 합성 펩티드를 이용하여 1주일의 간격으로 14회로 마우스의 뒷발바닥에 주사하여 면역화시켰다. 최종 주사 3일 후, 오금 림프계세포를 문헌[Chuntharapai et al., Methods Enzymol 288:15, 1997]에 기재된 바와 같이 35% 폴리에틸렌 글리콜을 이용한 표준 융합 방법을 이용하여 P3/X63-Ag8U1 마우스 골수종 세포와 융합시켰다. 융합 10일 후, 하이브리도마 배양 상층액을 상기 기재된 FGF2 결합 ELISA를 이용하여 FGF2로의 결합 능력에 대해 스크리닝하였다. 이후, 선택된 mAb를 FGFR1-Fc/FGF-Flag 결합 ELISA에서 블로킹 활성에 대해 스크리닝하였다. 이후, 선택된 하이브리도마를 문헌[Harlow et al., 1988]에 기재된 바와 같은 제한 희석 기술을 이용하여 2회 클로닝시켰다.

[0073] 표: 면역화 프로토콜

주사 번호	발바닥(footpad)당 항원 (MPL/TDM 중)
1	GST-FGF2 10 μg
2	GST-FGF2 5 μg
3	GST-FGF2 2.5 μg
4 – 7	GST-FGF2 5 μg
8 – 9	GST-FGF2 10 μg
10	GST-FGF2 (5 μg) + FGF2-Fc (5 μg)
11	FGF2-Fc (2 μg) + 펩티드 #1 & # 3 (2 μg)
12	FGF2-Fc (2 μg) + 펩티드 #1, #3 & #4 (3 μg)
13	FGF2-Fc (2 μg) + 펩티드 #1, #3 & #4 (3 μg)
14	FGF2-Fc 2 μg

[0074]

[0075] 도 1은 상기 방식으로 발생된 mAb GAL-F2가 인간 및 마우스 FGF2 둘 모두에 대략 동등하게 잘 결합하는 반면, 음성 대조군 마우스 IgG mAb는 FGF2에 결합하지 않는 것을 나타낸다. 도 2는 GAL-F2가 4개의 FGF 수용체 FGFR1-4의 각각으로의 인간 FGF2의 결합을 억제할 수 있으나, 대조군 mAb 5G8은 그렇지 않은 것을 나타낸다. 상기 기재된 FGFR-Fc/FGF2-Flag 결합 ELISA를 이용한 또 다른 실험에서, GAL-F2(10 μg/ml의 농도)는 4개의 FGFR인 FGFR1, FGFR2, FGFR3 및 FGFR4의 각각으로의 FGF2의 결합을 완전히 억제(즉, 실험 오차 내에서 신호를 백그라운드 수준으로 감소시킴)한 반면, 항-FGF2 mAb bFM-1 및 3H3은 결합을 실질적으로 감소시켰으나 완전히 감소시키지 않았다.

[0076] 실시예 3: GAL-F2의 에피토프

[0077] 3H3(Calbiochem), mAb bFM-1(Millipore) 및 mAb FB-8(Abcam)과 같은 특정 중화 활성을 갖는 것으로 보고된 여러 시판되는 항-FGF2 mAb를 구입하였다. GAL-F2가 상기 mAb 중 임의의 것과 동일한 에피토프를 갖는지 결정하기 위해 경쟁 결합 ELISA를 수행하였다. ELISA 플레이트를 밤새 50 μl/웰의 헤파린(50 μg/ml)으로 코팅시키고, 이를 따라내고, 1시간 동안 50 μl/웰의 FGF2와 함께 인큐베이션시켰다. 2% BSA를 이용하여 블로킹시킨 후, 웰을 다양한 농도의 시험되는 각각의 항-FGF2 mAb의 존재하에서 0.5 μg/ml의 비오티닐화된 GAL-F2 mAb와 함께 인큐베이션시켰다. 각각의 웰에서의 FGF2로의 비오티닐화된 GAL-F2 결합의 수준을 HRP-스트렙타비딘의 첨가 후, TMB 기질을 첨가하여 검출하였다. 도 3은 mAb 3H3, bFM-1 및 FB-8 중 어느 것과 음성 대조군 마우스 mAb(mIgG)가 FGF2로의 결합에 대해 GAL-F2와 경쟁하지 않는 반면, 당연히 GAL F2가 자신과 경쟁하는 것을 나타낸다. 따라서, 시험된 상기 항-FGF2 mAb는 FGF2 상에 GAL-F2와 동일 또는 중첩 에피토프를 갖지 않는다.

[0078] 실시예 4: GAL-F2에 의한 FGF2-유도 증식의 억제

[0079] BaF3 세포(DSMZ, Germany)를 10% FCS, 10% WEHI-3 적응용 배지 및 항생제가 보충된 RPMI 1640 배지(GIBCO)에서 유지시켰다. 안정적인 FGFR1c 또는 FGFR2c 발현 Ba/F3 세포를 문헌[Ornitz et al, 1996]에 기재된 바와 같이 선형화된 FGFR1c 및 FGFR2c 발현 벡터 DNA의 전기천공에 의해 생성시켰다. 안정적인 트랜스펙션된 세포를 10일 동안 G418(600 μg/ml)을 이용하여 선택하였다. 안정적인 FGFR1c 또는 FGFR2c를 발현하는 Ba/F3 트랜스펙턴트는 WEHI-3 배지의 부재하에서 FGF2에 반응하여 증식하는 것을 나타내었다. GAL-F2 mAb의 블로킹(중화) 활성을 결정하기 위해, FGFR1c-발현 또는 FGFR2c-발현 BaF3 세포(10,000 세포/웰)를 세척하고, 다양한 농도의 GAL-F2의 존재하에서 10% FCS 및 2 μg/ml의 헤파린 및 20 ng/ml의 FGF-2를 갖는 RPMI에 재현탁시켰다. 37℃ 및 5% CO_2에서 36-48 시간 동안의 인큐베이션 후, 2시간 동안 WST-I(Roche Applied Science)의 첨가에 의해 증식 수준을 결정하였다. 도 4는 GAL F2가 10 μg/ml mAb에서 거의 완전히 FGF2-유도 증식을 억제한 것을 나타낸다.

[0080] 정상 상피세포에 대한 GAL-F2의 블로킹 활성을 Mv 1 Lu 밍크 폐 상피세포(ATCC로부터 CCL-64)를 이용하여 결정하였다. 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 성장된 Mv 1 Lu 세포(2×10^3 세포/100 μl/웰)를 혈청 비함유 DMEM에 재현탁시키고, 1-2 ng/ml의 FGF2, 및 1 ng/ml의 TGF-β로 자극시켜, 24시간 동안 다양한 농도의 mAb의 존재하에서 백그라운드 증식을 억제하였다. 세포 증식의 수준을 24-48시간 동안 WST-1(Roche Applied Science)의 첨가에 의해 결정하였다. 도 5는 GAL-F2가 1 μg/ml mAb에서 거의 완전히 Mv 1 Lu 세포의 FGF2-유도 증식을 억제한 것을 나타낸다. 유사한 실험에서, GAL-F2는 10 ng/ml FGF2에 의해 유도된 HUVEC의 증식을 0.1 μg/ml(즉, FGF2에 대해 대략 등몰비(equimolar ratio))의 농도에서 약 75%, 및 1.0 μg/ml의 농도에서 완전히 억제하였다. 이는 bFM-1 항-FGF2 mAb에 의한 억제 정도보다 다소 나았고, 3H3 항-FGF2 mAb에 의한 억제 정도보다 충분히 나았으며, 이는 내피세포의 증식이 혈관형성에서 필수 단계임으로 인해 GAL-F2가 혈관형성을 억제하는 것을 암시한다.

[0081] 실시예 5: 클론원성 검정

[0082] GAL-F2의 항종양 활성을 연성 아가에서의 인간 종양 세포의 집락 형성에 대한 이의 효과에 의해 시험관내에서 연구하였다. 검정을 다음과 같이 수행하였다: 6-웰 플레이트를 10% FCS를 함유하는 DMEM 중의 1.5 ml/웰의 0.6% 아가로 코팅시킨 후, 10% FCS를 갖는 DMEM 중의 1.5 ml의 0.3% 아가로 층을 이루게 하였다. 상부 아가 층을 2×10^4 SMMC-7721 인간 간암 종양 세포 및 10 μg/ml의 mAb와 혼합시켰다. 플레이트를 10 내지 14일 동안 가습화된 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션시킨 후, 1시간 동안 0.005% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색시키고, 사진용 현미경(photomicroscopy)으로 시험하였다. 도 6은 관련이 없는 대조군 마우스 IgG mAb의 존재하에서의 세포에 비해, GAL-F2의 존재하에서의 세포가 많이 적은 집락을 형성시킨 반면, bFM-1 항-FGF2 mAb는 집락의 수를 감소시키지 않은 것을 나타낸다. 따라서, GAL-F2는 인간 종양 세포의 연성 아가에서 집락 형성을 억제하였다.

[0083] 실시예 6: 혈관형성 검정

[0084] GAL-F2의 항-혈관형성 활성을 30 ng의 FGF2 및/또는 3 μg GAL-F2를 포함하거나 포함하지 않는 0.4 ml의 마트리겔(matrigel)(BD Biosciences)을 등에 주사하여 BALB/c 마우스에서 결정하였다. 마트리겔 플러그(plug)를 6일째에 사진촬영을 위해 수거하였다. FGF2는 상기 검정에서 혈관 형성을 자극한 반면, GAL-F2는 상기 자극을 적어도 부분적으로 억제하였다.

[0085] 실시예 7: 이종이식편 모델

[0086] 문헌[Kim et al., Nature 362:841, 1993]에 이전에 기재된 바와 같이 이종이식편 실험을 수행하였다. 전형적으로 완전 DMEM 배지에서 성장된 인간 종양 세포를 HBSS에 수거하였다. 암컷 무흉선 누드 마우스 또는 NIH-III Xid/Beige/누드 마우스(4-6주령)에 등 부위에 0.1 ml의 HBSS 중의 2-10 x 10^6개의 세포를 피하 주사하였다. 종양 크기가 50-100 mm^3에 도달하는 경우, 마우스를 무작위로 그룹화시키고, 5 mg/kg(전체 100 μg)의 mAb를 0.1 ml의 부피로 1주일에 2회 복막내 투여하였다. 2차원[길이(a) 및 폭(b)]적으로 측정하여 종양 크기를 1주일에 2회 결정하였다. 종양 부피를 V = ab2/2에 따라 계산하고, 평균 종양 부피 ± SEM으로 표현하였다. 각각의 처리 그룹의 마우스의 수는 통상적으로 5-7마리의 마우스였다. 통계 분석은, 예를 들어, 스튜던트 t 검정(Student's t test)을 이용하여 수행될 수 있다.

[0087] 도 7은 GAL-F2가 RPMI 4788 결장 종양 이종이식편의 성장을 강하게 억제한 것을 나타내고, 도 8은 bFM-1 항-

FGF2 mAb가 GAL-F2보다 적은 정도로 이종이식편 성장을 억제한 것을 나타낸다. 도 9는 GAL-F2가 Xid/Beige/누드 마우스에서 SMMC-7721 간암 종양 이종이식편을 억제한 반면, 1주일에 1회의 5 mg/kg의 화학요법 약물 시스플라틴이 보다 적은 정도로 이종이식편 성장을 억제한 것을 나타낸다. GAL-F2 및 시스플라틴의 조합물은 둘 중 어느 하나의 작용제 단독보다 강하게 억제하였는데, 이는 상기 작용제의 추가 또는 상승작용적 효과를 나타낸다. 도 10은 GAL-F2가 누드 마우스에서 에르비툭스®가 유래되는 항-EGF 수용체 mAb M225보다 강하게 HepG2 간암 종양 이종이식편을 억제하나, GAL-F2 및 M225의 조합물이 둘 중 어느 하나의 작용제 단독보다 다소 더 강하게 억제한 것을 나타내며, 이 또한 상기 작용제의 추가 또는 상승작용적 효과를 나타낸다. 그러나, GAL F2는 시험된 모든 이종이식편의 성장을 억제할 수 없었는데, 이는 상기 이종이식편이 성장을 위해 FGF2에 의존하지 않기 때문일 가능성이 높다.

[0088] 실시예 8: GAL-F2의 인간화

[0089] GAL-F2 mAb의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 클로닝, 키메라 mAb의 제작 및 발현, 및 인간화된 GAL-F2 mAb의 설계, 제작, 발현 및 정제를 모두, 예를 들어, 모든 목적상 참조로서 본원에 포함되는 L2G7 mAb에 대한 미국 특허 출원 11/731,774호에 기재된 바와 같은 표준 분자생물학 방법을 이용하여 수행하였다. GAL-F2의 (성숙) 경쇄 및 중쇄 가변(V) 영역의 아미노산 서열은 도 11A 및 11B 각각의 윗줄에 라벨링된 GAL-F2에 제시되어 있다. 더욱 특히, 인간화된 GAL-F2 mAb를 설계하기 위해, 일반적으로 퀸 등(Queen et al)의 미국 특허 출원 제 5,530,101호 및 제 5,585,089호의 방법을 따랐다. 도 11A 및 11B 각각의 아랫줄에 제시된 인간 Vκ 서열 ABA70776 및 VH 서열 AAL04519를 각각 GAL-F2 VL 및 VH 서열에 대한 수용자 서열로 제공하기 위해 선택하였는데, 이는 이들이 특히 높은 프레임워크 상동성(즉, 서열 동일성)을 갖기 때문이다. CDR과 잠재적으로 상호작용하기 위해 CDR에 충분히 근접하여 GAL-F2 프레임워크 내에 아미노산을 위치시키기 위해, GAL-F2 가변 도메인의 컴퓨터 생성 분자 모델을 이용하였다. 인간화된 GAL-F2 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 설계하기 위해, 마우스 GAL-F2 mAb로부터의 CDR을 먼저 개념적으로 수용자 프레임워크 영역에 이식하였다. 컴퓨터 모델이 CDR 형태를 유지하기 위해 필요할 수 있는 CDR과의 유의한 접촉을 제시한 프레임워크 위치에서, 인간 프레임워크 아미노산을 마우스 항체로부터의 아미노산으로 대체시켰다. HuGAL-F2로 명명된 인간화된 GAL-F2 mAb를 위해, 이를 케이뱃 넘버링을 이용하여 중쇄의 잔기 1, 27 및 30(초티아 과가변 루프 H1 내에 존재하는 잔기 27 및 30), 48, 67, 71 및 94에서 수행하였고, 경쇄에서는 어느 잔기에서도 수행하지 않았다. HuGAL-F2의 경쇄 및 중쇄 V 영역은 도 11A 및 11B 각각의 중간줄에 라벨링된 HuGAL-F2에 도시되어 있고, 여기서 이들은 각각의 GAL-F2 공여자 및 인간 수용자 V 영역에 대해 정렬되고, CDR(케이뱃에 의해 규정됨)은 밑줄로 표시되고, 상기 나열된 치환된 아미노산은 이중 밑줄로 표시된다.

[0090] 본 발명은 도 11에 도시된 경쇄 및 중쇄 V 영역을 포함하는 인간화된 GAL-F2 mAb HuGAL-F2 뿐만 아니라, 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 보통 프레임워크 내(그러나, CDR에서도 가능함)의 적은 수(예를 들어, 통상적으로 1, 2, 3, 5 또는 10개 이하)의 치환, 결실 또는 삽입에 의해 HuGAL-F2의 서열과 상이한 인간화된 변이체 GAL-F2 mAb를 제공한다. 특히, 상기 기재된 치환의 서브셋만이 수용자 프레임워크에서 이루어질 수 있거나, 추가의 치환(들)이 이루어질 수 있고, 예를 들어, 마우스 GAL-F2 VH 아미노산 69L이 수용자 아미노산 69I를 대체할 수 있거나, 마우스 아미노산이 케이뱃 넘버링에 의해 위치 1, 3, 60 및/또는 67 중 어느 하나 또는 모두에서 인간화된 경쇄 내의 각각의 아미노산을 대체할 수 있다. 다른 한편으로, VH 아미노산 1E(Glu)는 Q(Gln)를 대신할 수 있다. 또한, HuGAL-F2에서 CDR과 접촉하지 않는 많은 프레임워크 잔기는 GAL-F2 또는 다른 마우스 또는 인간 항체의 상응하는 위치로부터의 아미노산의 치환을 수용할 수 있고, 더욱 많은 잠재적 CDR-접촉 잔기가 또한 치환될 수 있거나, 심지어 CDR 내의 아미노산이 변경될 수 있다. CDR 치환의 한 예는 CDR 내의 잔기를 가변 영역 프레임워크를 공급하는데 사용되는 인간 수용자 서열의 상응하는 위치를 점유하는 잔기로 치환시키는 것이다.

[0091] 가장 흔하게는, 인간화된 변이체 GAL-F2 서열에서 이루어지는 대체는 대체된 HuGAL-F2 아미노산과 관련하여 보존성이다. 아미노산은 보존성 치환, 즉, 그룹 내의 치환을 결정하기 위해 하기와 같이 그룹화될 수 있다: 그룹 Ⅰ(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 Ⅱ(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 Ⅲ(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 Ⅳ(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 Ⅴ(사슬 배향에 영향을 주는 잔기): gly, pro; 및 그룹 Ⅵ(방향족 측쇄): trp, tyr, phe.

[0092] 바람직하게는, HuGAL-F2에서의 대체(보존성 또는 비보존성)는 인간화된 mAb의 결합 친화성 또는 효능, 즉, FGF2의 생물학적 활성을 중성화시키는 능력에 실질적으로 영향을 미치지 않는다(예를 들어, 인간화된 변이체 GAL-F2 mAb의 본원에 기재된 검정 중 일부 또는 전부에서의 효능이 실험 오차 내에서 HuGAL-F2의 효능과 본질적으로 동일함). 바람직하게는, 성숙 변이체 경쇄 및 중쇄 V 영역 서열은 각각의 HuGAL-F2 성숙 경쇄 및 중쇄 V 영역에 대해 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상 동일하다. 대안적으로, GAL-F2의 항

체 가변 영역과 높은 서열 동일성을 갖는 다른 인간 항체 가변 영역이 또한 인간화된 항체 프레임워크, 특히 인간 서브그룹 I 로부터의 카파 V 영역 및 인간 서브그룹 I 로부터의 중쇄 V 영역 또는 이러한 서브그룹의 컨센서스 서열을 제공하기에 적합하다.

[0093] 다른 인간화된 항체에서, 예시된 항체(즉, H1, H27, H30, H48, H67, H71 및 94)와 관련하여 언급된 수용자 대 공여자 치환의 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상 또는 7개 모두가 바람직하게는 마우스 공여자 항체 중쇄의 상응하는 위치를 점유하는 잔기에 의해 점유된다. 중쇄 수용자 서열이 AAL04519가 아닌 경우, 수용자 대 공여자 치환은, 특정 위치를 점유하는 잔기가 수용자와 공여자 사이에서 이미 동일한지의 여부에 따라 특정 가변 프레임워크 영역 위치의 특정 점유를 필요로 할 수 있거나, 필요로 하지 않을 수 있다.

[0094] 본원에 논의된 예시적 mAb HuGAL-F2는, 예를 들어, 미국 특허 출원 제 11/731,774호에 제시된 인간 κ 및 γ1 불변 영역을 갖고, 이에 따라 이는 IgG1이다. HuGAL-F2의 (성숙) 경쇄 및 중쇄의 완전한 서열이 도 13에 도시되어 있다. 따라서, 예시적인 인간화된 항체는 서열 목록 번호:7의 경쇄 및 서열 목록 번호:8의 중쇄를 포함한다. 이러한 서열은 각각 Km(3) 및 G1m(3) 동종이형(allotype)이고, 임의의 (IgG1, κ) 동종이형의 IgG1 mAb가 지정 HuGAL-F2에 의해 포함되는 것이 이해된다. 또한, HuGAL-F2가 통상적인 절차에 의해 제조되는 경우, 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카르복시 말단의 1 내지 수개의 아미노산, 예를 들어, 중쇄의 C-말단 리신이 분자의 일정 비율 또는 모두에서 실종되거나 유도체화될 수 있고, 이러한 조성이 여전히 지정 HuGAL-F2에 포함되고, 인간화된 GAL-F2 mAb로 간주되는 것이 이해될 것이다. 다른 이소형의 인간화된 mAb(예를 들어, IgG2, IgG3 및 IgG4)가, HuGAL-F2 가변 영역과 적절한 인간 불변 영역을 조합시킴으로써 제조될 수 있다. 보체 매개 세포독성 또는 ADCC와 같은 효과기 기능을 감소시키거나 증가시키고(참조: Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; 및 Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), 인간에서의 반감기를 연장(참조: Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004)시키기 위해 HuGAL-F2 불변 영역에서 대체가 이루어질 수 있다. 특히, 비제한적으로, 위치 250에서의 Gln 및/또는 위치 428에서의 Leu로의 IgG 불변 영역 내의 돌연변이를 갖는 HuGAL-F2가 본 발명의 구체예이다.

[0095] HuGAL-F2의 결합 친화성과 마우스-인간 키메라 mAb ChGAL-F2의 결합 친화성을 비교하기 위해, 표준 ELISA 기술을 이용하여 경쟁 결합 실험을 수행하였다. 특히, 인간 FGF2를 헤파린 코팅된 ELISA 플레이트에 고정시켰다. 웰을 증가하는 농도의 라벨링되지 않은 ChGAL-F2, HuGAL-F2 또는 대조군 인간 항체 hIgG의 존재하에서 비오티닐화된 GAL-F2 mAb(0.5 μg/ml)와 함께 인큐베이션하였다. 결합된 비오티닐화된 GAL-F2의 수준을 HRP-스트렙타비딘 및 기질의 첨가에 의해 결정하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, HuGAL-F2 및 ChGAL-F2는 대략 동등하게 경쟁하였고, HuGAL-F2가 약간 더 낫게 경쟁하였으며, 이는 HuGAL-F2의 FGF2에 대한 결합 친화성이 적어도 ChGAL-F2만큼 높아, 이에 따라 본래의 마우스 GAL-F2 mAb만큼 높은 것을 나타낸다. 라벨링된 mAb의 결합을 50%까지 억제하는데 필요한 HuGAL-F2의 농도로부터, FGF2에 대한 HuGAL-F2의 결합 친화성 Ka가 적어도 약 10^{9} M^{-1}인 것으로 평가할 수 있다. HuGAL-F2는 또한 본원에 기재된 FGF2 활성에 대한 임의의 생물학적 검정으로 시험될 수 있으며, 이는 GAL-F2 mAb에 필적하게 FGF2 활성을 억제할 것이다.

[0096] 본 발명은 현재 바람직한 구체예를 참조로 하여 기재되었으나, 본 발명을 벗어남이 없이 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다. 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 본 발명의 임의의 단계, 구성요소, 구체예, 특징 또는 양태는 그 밖의 다른 것과 함께 사용될 수 있다. 인용된 등록 번호 등을 포함하는 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별적 간행물, 특허 및 특허 출원이 모든 목적상 전체내용이 참조로서 포함되는 것으로 특정하게 개별적으로 지정된 것과 동일한 범위로 모든 목적상 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 1개 이상의 서열이 상이한 시간의 등록 번호와 관련되는 경우, 2008년 5월 29일자의 등록 번호와 관련된 서열이 사용된다. 도면과 서열 목록의 해당 서열 사이에 임의의 불일치가 존재하는 경우, 도면이 우선한다.

[0097] 모노클로날 항체 GAL-F2를 생성하는 하이브리도마인 ATCC 번호 PTA-8864는 부다페스트 조약 하에 2008년 1월 8일에 미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection)(P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108)에 수탁되었다. 이러한 수탁물은 공인된 수탁자에 의해 유지될 것이고, 수탁자가 샘플의 배포에 대한 가장 최근의 요청을 받은지 적어도 5년 후의 기간, 수탁일로부터 적어도 30년 후의 기간, 또는 관련 특허의 시행가능한 기간 동안에서 가장 긴 기간 동안 돌연변이, 생존불가 또는 파괴의 경우에 대체될 것이다. 상기 세포주의 공공의 이용가능성에 대한 모든 제한은 출원으로부터 특허의 반포 후에 변경불가능하게 철폐될 것이다.

수탁번호

[0098]

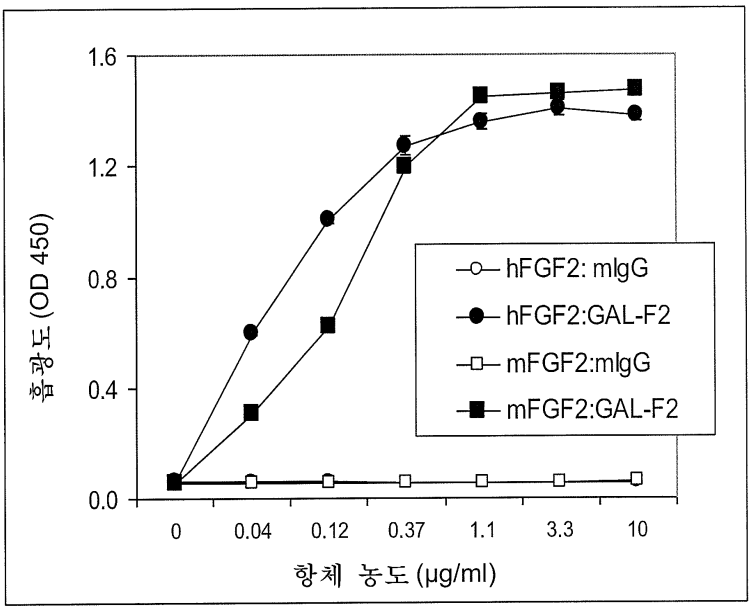
기탁기관명 : 미국 미생물보존센터(ATCC)(국외)

수탁번호 : PTA-8864

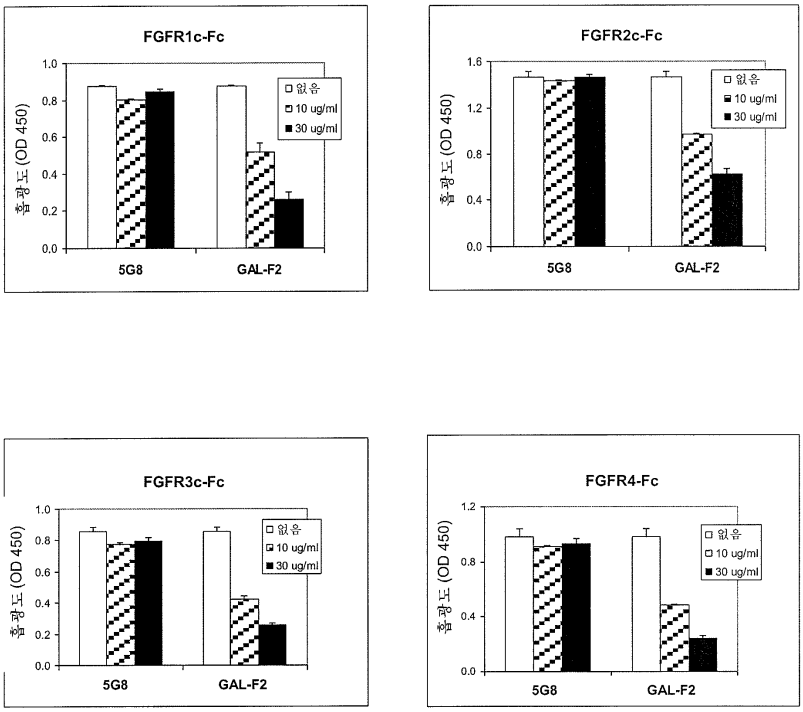
수탁일자 : 20080108

도면

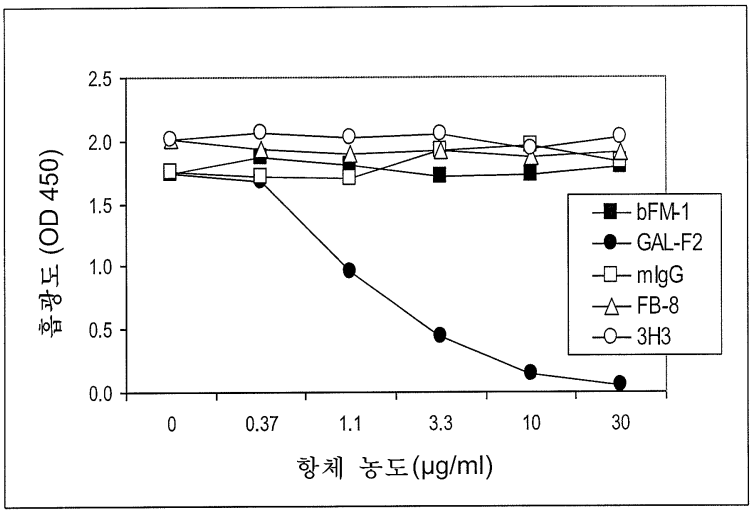
도면1



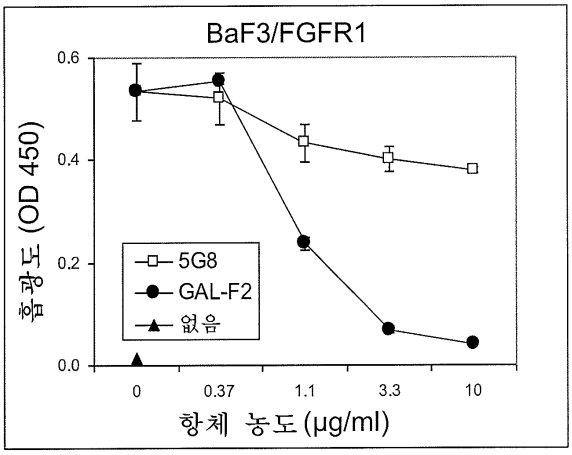
도면2

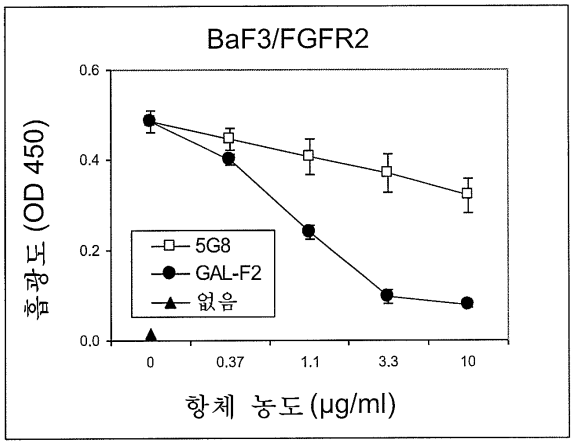

FGFR1c-Fc
흡광도 (OD 450)
없음
10 ug/ml
30 ug/ml
5G8
GAL-F2
FGFR2c-Fc
흡광도 (OD 450)
없음
10 ug/ml
30 ug/ml
5G8
GAL-F2
FGFR3c-Fc
흡광도 (OD 450)
없음
10 ug/ml
30 ug/ml
5G8
GAL-F2
FGFR4-Fc
흡광도 (OD 450)
없음
10 ug/ml
30 ug/ml
5G8
GAL-F2

도면3

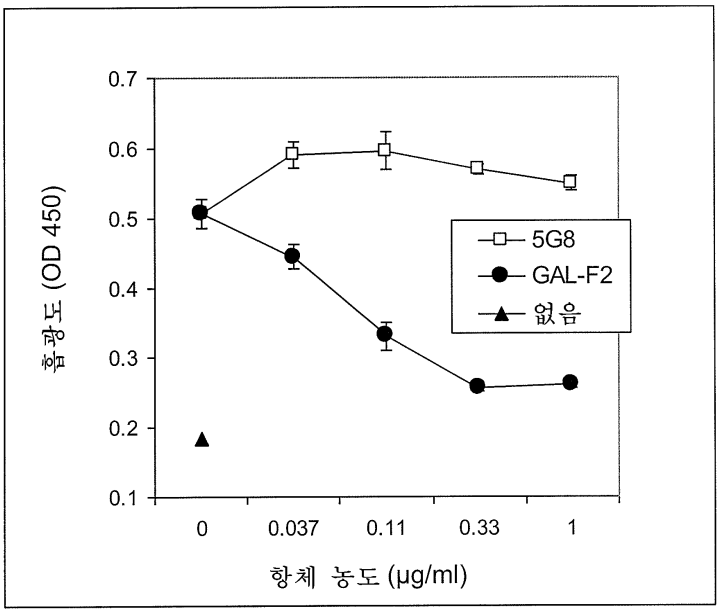

흡광도 (OD 450)
bFM-1
GAL-F2
mIgG
FB-8
3H3
0
0.37
1.1
3.3
10
30
항체 농도(μg/ml)

도면4

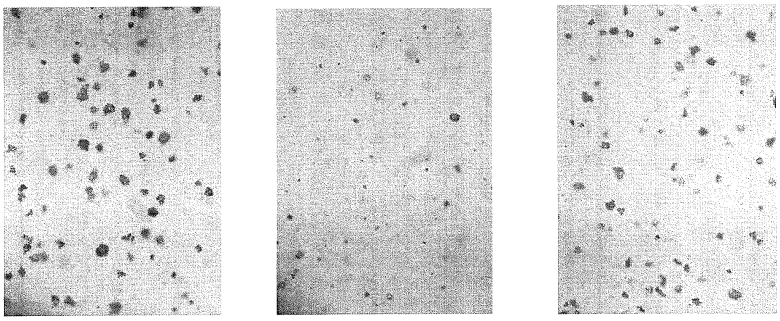

BaF3/FGFR1
흡광도 (OD 450)
0.6
0.4
0.2
0.0
5G8
GAL-F2
없음
0
0.37
1.1
3.3
10
항체 농도 (μg/ml)


BaF3/FGFR2
흡광도 (OD 450)
0.6
0.4
0.2
0.0
5G8
GAL-F2
없음
0
0.37
1.1
3.3
10
항체 농도 (μg/ml)

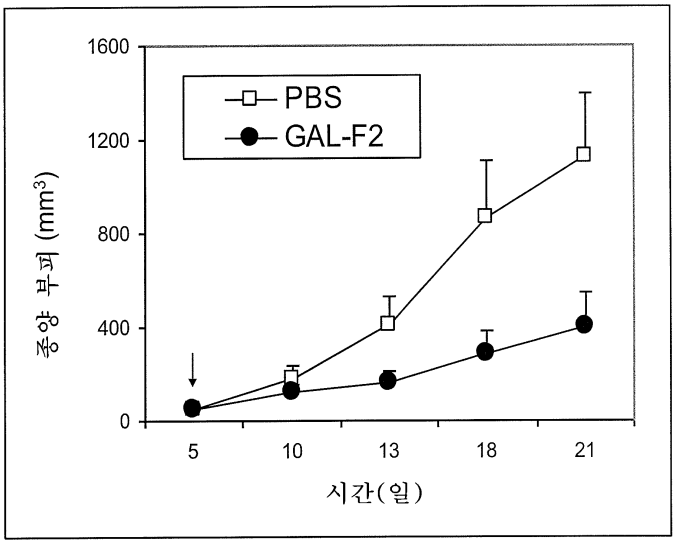
도면5


흡광도 (OD 450)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
5G8
GAL-F2
없음
0
0.037
0.11
0.33
1
항체 농도 (μg/ml)

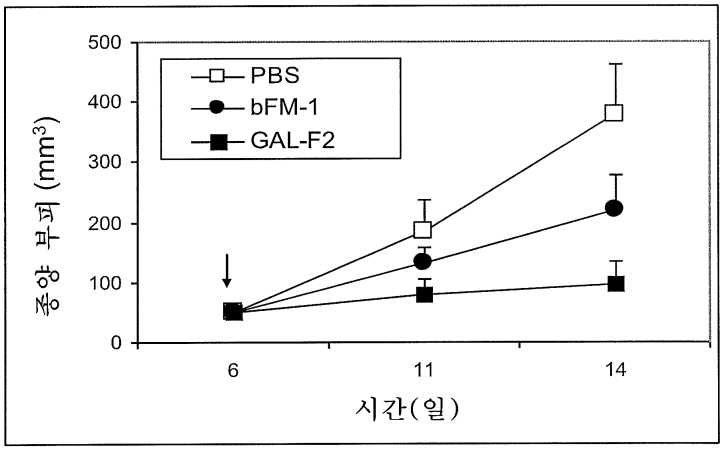
도면6


mIgG
GAL-F2
bFM-1

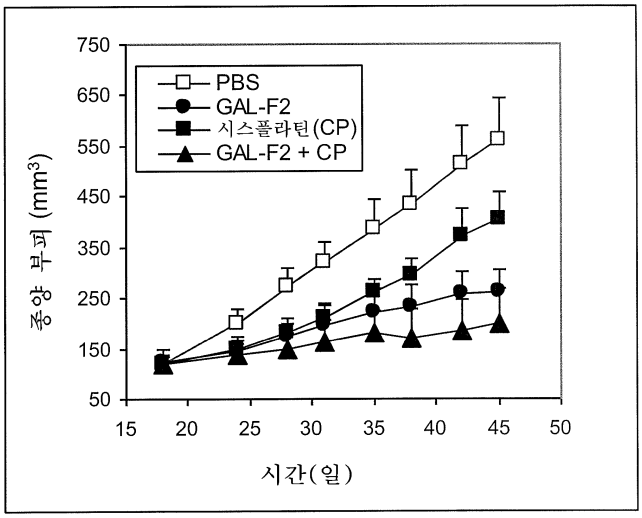
도면7


1600
1200
800
400
0
종양 부피 (mm³)
PBS
GAL-F2
5
10
13
18
21
시간(일)

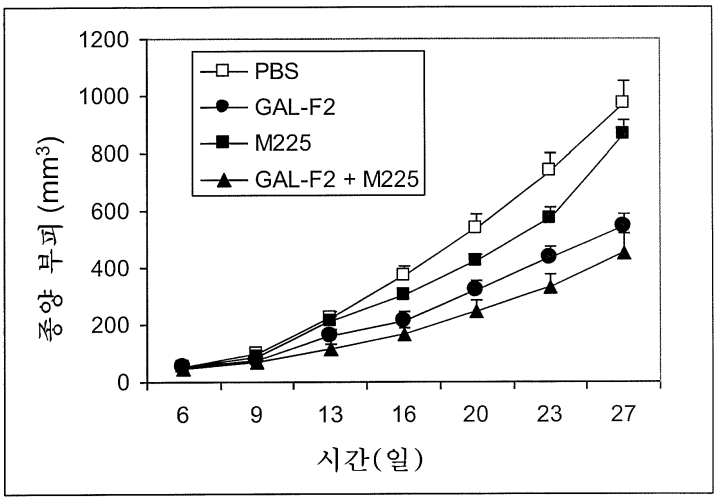
도면8


500
400
300
200
100
0
종양 부피 (mm³)
PBS
bFM-1
GAL-F2
6
11
14
시간(일)

도면9


PBS
GAL-F2
시스플라틴(CP)
GAL-F2 + CP
종양 부피 (mm3)
750
650
550
450
350
250
150
50
15
20
25
30
35
40
45
50
시간(일)

도면10


PBS
GAL-F2
M225
GAL-F2 + M225
종양 부피 (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
6
9
13
16
20
23
27
시간(일)

도면11

A

```
                    1          2          3          4
           1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
GAL-F2     SIVMTQTPKF LLVSAGDRVT MTCKASQSVS SDVGWYQQKP
HuGAL-F2   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVS SDVGWYQQKP
ABA70776   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCrasqsis sylnWYQQKP

                    5          6          7          8
           1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
GAL-F2     GQSPKLLIYS GSNRYSGVPD RFTGSGYGTD FTFTISTVQA
HuGAL-F2   GKAPKLLIYS GSNRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP
ABA70776   GKAPKLLIYa asslqsGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP

                    9         10
           1234567890 1234567890 1234567
GAL-F2     EDLAVYFCQQ DYYSPWTFGG GTKLEIK
HuGAL-F2   EDFATYYCQQ DYYSPWTFGQ GTKVEIK
ABA70776   EDFATYYCqq systpwtFGQ GTKVEIK
```

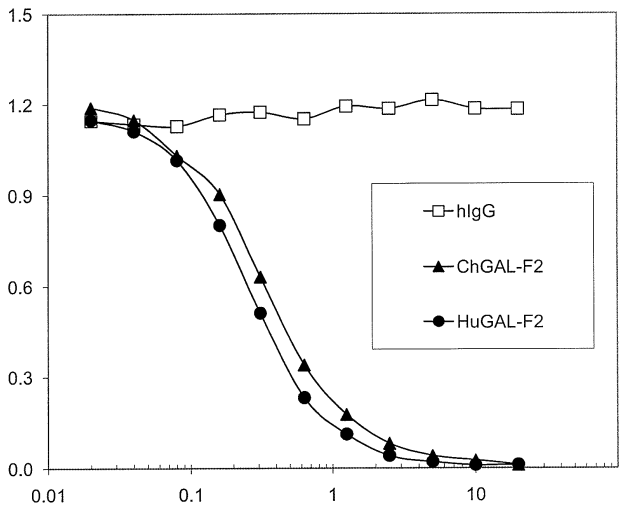
B

```
                    1          2          3          4
           1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
GAL-F2     EVHLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT NYVINWVKQK
HuGAL-F2   EVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT NYVINWVRQA
AAL04519   QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS syaisWVRQA

                    5    a     6          7          8
           1234567890 12234567890 1234567890 1234567890
GAL-F2     PGQGLEWIGY NDPYNDVSKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM
HuGAL-F2   PGQGLEWIGY NDPYNDVSKYN EKFKGRATIT SDKSTSTAYM
AAL04519   PGQGLEWMGg iipifgtanya qkfqgRVTIT ADKSTSTAYM

             abc        9          10ab cd         11
           1222234567890 123456789000 00 1234567890123
GAL-F2     ELSSLTSEDSAVY YCAKEGGGKYVY AM DSWGQGTSVTVSS
HuGAL-F2   ELSSLRSEDTAVY YCAKEGGGKYVY AM DSWGQGTTVTVSS
AAL04519   ELSSLRSEDTAVY YCARvgqlgyyyygm dvWGQGTTVTVSS
```

도면12



도면13

A

```
 1                                                   D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S
11   L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  K  A  S  Q  S  V  S  S  D  V  G  W  Y  Q  Q  K  P
41   G  K  A  P  K  L  L  I  Y  S  G  S  N  R  Y  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D
71   F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  D  Y  Y  S  P  W  T  F  G  Q
101  G  T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A
131  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q
161  E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K
191  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G  E  C
```

B

```
 1                                                   E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K
13   K  P  G  S  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  N  Y  V  I  N  W  V  R  Q  A  P  G
43   Q  G  L  E  W  I  G  Y  N  D  P  Y  N  D  V  S  K  Y  N  E  K  F  K  G  R  A  T  I  T  S
73   D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  E  G  G  G
103  K  Y  V  Y  A  M  D  S  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L
133  A  P  S  S  K  S  T  S  G  G  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W
163  N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S  G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V
193  P  S  S  S  L  G  T  Q  T  Y  I  C  N  V  N  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  E  P  K
223  S  C  D  K  T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K  P  K
253  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y
283  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V
313  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K
343  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  E  E  M  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L
373  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L
403  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M
433  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K
```

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Kim, Kyung Jin

Wang, Lihong

Park, Hangil

Vasquez, Maximiliano

Galaxy Biotech, LLC

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO BASIC

FIBROBLAST GROWTH FACTOR

<130> 022382-000820PC

<140> Not yet assigned

<141> Not yet assigned

<150> US 61/057,183

<151> 2008-05-29

<150> US 61/170561

<151> 2009-04-17

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> GAL-F2

<400> 1

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Ser 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 Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuGAL-F2

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> immunoglobulin kappa light chain variable region

<400> 3

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> GAL-F2

<400> 4

Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Val Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Gly Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuGAL-F2

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Glu Gly Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> immunoglobulin heavy chain variable region

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Gly Gln Leu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuGAL-F2 antibody light chain

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuGAL-F2 antibody heavy chain

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Gly Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450