(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0021589
(43) 공개일자 2014년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7025948
(22) 출원일자(국제) 2012년04월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년10월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/032491
(87) 국제공개번호 WO 2012/138975
국제공개일자 2012년10월11일
(30) 우선권주장
61/473,106 2011년04월07일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
데니스, 마크
미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크.
데스노이어스, 루크
미국 94127 캘리포니아 샌프란시스코 클레어몬트 불러바드 250
프렌치, 도로시
미국 94127 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크.
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **항-FGFR4 항체 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 항-FGFR4 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다.

[대표도]

도 11

특허청구의 범위

청구항 1

FGFR4에 결합하는 단리된 항체이며, 이러한 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합하는 것인 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-FGFR4 항체가 인간, 마우스 및 시노몰구스 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합하는 것인 단리된 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 항-FGFR4 항체가 인간 FGFR4에 ≤ 0.05 nM의 친화도로 결합하는 것인 단리된 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항-FGFR4 항체가 도 12d에 제시된 아미노산 서열을 갖는 마우스 C3 단백질에 실질적으로 결합하지 않는 것인 단리된 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항-FGFR4 항체가 G165A 돌연변이를 포함하는 인간 FGFR4에 유의하게 결합하지 않는 것인 단리된 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항-FGFR4 항체가 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 150 내지 170을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 것인 단리된 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 항-FGFR4 항체가 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 150 내지 170을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 폴리펩티드에 결합하는 것인 단리된 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항-FGFR4가 FGFR4 활성의 길항제인 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, FGFR4 활성이 FGF 유도된 세포 증식, FGFR4에 대한 FGF 결합, FGF19에 노출된 세포에서의 CYP7α7 발현의 FGF19-매개된 억제, 또는 FGF19-유도된 콜로니 형성인 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, FGFR4에 대한 FGF1 및/또는 FGF19 결합이 억제된 것인 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, FGFR4에 대한 FGF1 결합의 억제에 대한 IC50이 약 0.10 nM이고, FGFR4에 대한 FGF19 결합의 억제에 대한 IC50이 약 0.10 nM인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 13

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

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, FGFR4에 결합하는 항체 단편인 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및 (c) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함하는 항체.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 18

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 9, 10, 11 및/또는 12의 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 추가로 포함하는 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 13, 14, 15 및/또는 16의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 추가로 포함하는 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 서열 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, 서열 7의 VH 서열을 포함하는 항체.

청구항 23

제21항에 있어서, 서열 8의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 24

서열 7의 VH 서열 및 서열 8의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 IgG1 항체인 항체.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 27

제26항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 28

제27항의 숙주 세포를 항체가 생산되도록 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체.

청구항 31

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제.

청구항 32

제16항에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 제제.

청구항 33

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 항체.

청구항 34

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 항체.

청구항 35

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 증식의 억제에 사용하기 위한 항체.

청구항 36

의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 37

제36항에 있어서, 의약이 암의 치료를 위한 것인 용도.

청구항 38

제36항에 있어서, 의약이 세포 증식의 억제를 위한 것인 용도.

청구항 39

암을 앓는 개체에게 유효량의 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓는 개체를 치료하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 개체에게 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 41

개체에게 유효량의 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 투여하여 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는, 개체에서 세포 증식을 억제하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 2011년 4월 7일에 출원된 미국 특허 출원 번호 61/473,106을 우선권 주장하며, 그의 내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] <서열 목록>

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 양식으로 제출되었고, 그의 전체가 본원에 참고로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2012년 3월 22일에 생성된 상기 ASCII 복사본은 P4524R1WO.txt로 명명하고, 크기는 37,020 바이트이다.

[0005] <발명의 분야>

[0006] 본 발명은 항-FGFR4 항체 및 그의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 섬유모세포 성장 인자 (FGF)는 다양한 생물학적 활성을 갖는 22가지 구조적으로 관련된 폴리펩티드의 패밀리를 포함하고; 이러한 신호전달 분자의 대부분은 수용체 티로신 키나제의 패밀리인 그의 동족 수용체 (FGFR; FGFR1-4로 지칭됨)에 결합하여 이를 활성화시킴으로써 기능한다 (문헌 [Eswarakumar et al., 2005; Ornitz and Itoh, 2001]). 이러한 수용체-리간드 상호작용은 수용체 이량체화 및 자가인산화, 막-연관 및 시토졸 보조 단백질과의 복합체의 형성, 및 다중 신호전달 캐스케이드의 개시를 일으킨다 (문헌 [Powers et al., 2000]). FGFR-FGF 신호전달 시스템은 세포 기능/과정, 예컨대 성장, 분화, 이동, 형태발생 및 혈관신생을 조절함으로써 발생 및 조직 복구에서 중요한 역할을 한다.

[0008] FGFR의 변경 (즉, 과다발현, 돌연변이, 전위 및 말단절단)은 골수종 유방, 위, 결장, 방광, 췌장 및 간세포성 암종을 포함하는 수많은 인간 암과 연관된다 (문헌 [Bange et al., 2002; Cappellen et al., 1999; Chesi et al., 2001; Chesi et al., 1997; Gowardhan et al., 2005; Jaakkola et al., 1993; Jang et al., 2001; Jang et al., 2000; Jeffers et al., 2002; Xiao et al., 1998]). 간세포성 암종 (HCC)은 암 관련된 사망의 주요한 세계적 원인 중 하나이고, 해마다 오십만명이 넘는 사망자를 초래한다 (문헌 [Shariff et al., 2009]). 암에서의 FGFR4의 역할은 완전하게 설명될 필요가 남아있으나, 여러 발견은 이 수용체가 HCC 발생 및/또는 진행에서 중요한 역할을 수행할 수 있다고 제안한다. FGFR4는 인간 간세포에 존재하는 우세한 FGFR 이소형이고 (문헌 [Kan et al., 1999]); 본 발명자들은 또한 간 조직이 최고의 FGFR4 전사체 수준을 갖는다고 이전에 보고하였다 (문헌 [Lin et al., 2007]). 간 암종 (뿐만 아니라 여러 다른 유형의 인간 종양)에서 과다발현되는 FGFR4 뿐만 아니라, 여러 미스센스 유전자 변경이 HCC 환자 샘플에서 관찰되었으며; 특히 FGFR4에서 매우 빈번한 G388R 단일 뉴클레오티드 다형성 (두경부 암종의 경우에 감소된 생존 뿐만 아니라 결장, 연부 조직, 전립선 및 유방 암종의 경우에 보다 공격성인 표현형과 연관됨)이 확인되었다 (문헌 [Ho et al., 2009]). 또한, 마우스에서 FGF19 (즉, FGFR4-특이적 리간드)의 이소성 발현이 간세포 증식, 간세포 이형성 및 신생물을 촉진한다는 것이 이전에 입증되었다 (문헌 [Nicholes et al., 2002]).

[0009] 치료제로서의 개발에 최적인 임상적 특성을 갖는 작용제가 계속 요구된다는 것이 명백하다. 본원에 기재된 본 발명은 이러한 요구를 충족시키고, 다른 이익을 제공한다.

[0010] 특허 출원 및 공보를 포함한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그의 전체내용이 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 항-FGFR4 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다.

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 FGFR4에 결합하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 이 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간, 마우스 및 시노몰구스 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR4에 ≤ 0.05 nM의 친화도로 결합한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 도 12d에 제시된 아미노산 서열을 갖는 마우스 C3 단백질에 실질적으로 결합하지 않는다.

[0014] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 변성된 FGFR4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 변성되고 환원된 FGFR4에 결합한다. 일부 실시양태에서, FGFR4에 대한 항-FGFR4 항체의 결합은 웨스턴 블롯을 이용하여

검출된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 G165A 돌연변이를 포함하는 인간 FGFR4에 유의하게 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 150 내지 170을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 폴리펩티드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 150 내지 170을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 폴리펩티드에 결합한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4는 FGFR4 활성의 길항제이다. 일부 실시양태에서, FGFR4 활성은 FGF 유도된 세포 증식, FGFR4에 대한 FGF 결합, FGF19에 노출된 세포에서의 CYP7α7 발현의 FGF19-매개된 억제, 또는 FGF19-유도된 콜로니 형성이다. 일부 실시양태에서, FGFR4에 대한 FGF1 및/또는 FGF19의 결합이 억제된다. 일부 실시양태에서, FGFR4에 대한 FGF1 결합의 억제에 대한 IC50은 약 0.10 nM이고, FGFR4에 대한 FGF19 결합의 억제에 대한 IC50은 약 0.10 nM이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 모노클로날 항체이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGFR4에 결합하는 항체 단편이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및 (c) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 9, 10, 11 및/또는 12의 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 13, 14, 15 및/또는 16의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 7의 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 8의 VL 서열을 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 7의 VH 서열 및 서열 8의 VL 서열을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 항체는 전장 IgG1 항체이다.

[0027] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0028] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한 본원에 기재된 숙주 세포를 항체가 생산되도록 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 추가로 포함한다.

[0030] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0031] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약 제제는 추가의 치료제를 추가로 포함한다.

[0032] 본 발명은 또한 의약으로 사용하기 위한 본원에 기재된 임의의 항체를 제공한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 항체는 암의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0034] 일부 실시양태에서, 항체는 세포 증식의 억제에 사용하기 위한 것이다.

[0035] 일부 실시양태에서, 항체는 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다.

[0036] 일부 실시양태에서, 의약은 암의 치료를 위한 것이다.

[0037] 일부 실시양태에서, 의약은 세포 증식의 억제를 위한 것이다.

[0038] 본 발명은 또한 암을 앓는 개체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 개체에게 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0039] 본 발명은 또한 개체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항체를 투여하여 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는, 개체에서 세포 증식을 억제하는 방법을 제공한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 암은 유방, 폐, 췌장, 뇌, 신장, 난소, 위, 백혈병, 자궁 내막, 결장, 전립선, 뇌하수체, 유방 섬유선종, 두경부, 연부 조직, 신경모세포종, 흑색종, 자궁 내막, 고환, 담관암종, 담낭 및/또는 간의 암이다.

[0041] 특정 실시양태에서, 암은 FGFR4 발현 (예컨대 과다발현), 증폭 또는 활성화를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 암은 FGFR4 증폭을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1: FGFR4는 FGF19-매개된 간 종양발생에 요구된다. a, 생후 10개월의 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스 (좌측 패널)의 간 표면으로부터 돌출된 다수의 크게 발생한 종양 (화살표). 생후 10개월의 FGF19-TG:FGFR4-KO 마우스 (우측 패널)로부터의 간. b, FGFR4-KO 또는 FGFR4-WT 마우스와 교배시킨 암컷 (좌측 패널) 및 수컷 (우측 패널) FGF19-TG 또는 야생형 마우스에서의 BrdU 혼입. c, DEN으로 처리된 생후 4개월의 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스의 간의 표면 상의 다수의 크게 발생한 종양 (화살표). d, 총체적 및 조직학적 조사에 의해 결정된 바와 같은 DEN으로 처리된 수컷 및 암컷 FGF19-TG 마우스에서의 간 종양의 유병률. e, DEN으로 처리된 FGF19-TG 또는 야생형 암컷 (좌측 패널) 및 수컷 (우측 패널) 마우스로부터의 간 중량. 별표 (*)는 DEN으로 처리된 수컷 FGF19-TG 마우스가 생후 6개월이 넘게 생존하지 못하였기 때문에 7개월 시점으로부터는 이들의 간 중량을 측정할 수 없었다는 것을 나타낸다. f, DEN으로 처리된 FGF19-TG 또는 야생형 암컷 (좌측 패널) 및 수컷 (우측 패널) FGFR4-KO 마우스의 간 중량.

도 2: LD1은 FGFR4에 결합한다. a, LD1은 인간 (h), 마우스 (m) 및 시노몰구스 (c) FGFR4에 결합하지만, hFGFR1, hFGFR2 또는 hFGFR3에는 결합하지 않는다. 고정화된 FGFR-Fc 키메라 단백질에 대한 LD1의 결합을 고체 상 결합 검정에 의해 결정하였다. b, 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 바와 같은 마우스, 시노몰구스 및 인간 FGFR4에 대한 LD1 결합의 친화도. c, FACS에 의해 측정된 바와 같은 안정하게 형질감염된 HEK293 세포의 세포 표면에서 발현된 hFGFR4에 대한 LD1의 결합 (RFU = 상대적 형광 단위). d, 고체 상 결합 검정에 의해 측정된 바와 같은 점 돌연변이를 보유하는 고정화된 hFGFR4-플래그 키메라 단백질에 대한 LD1의 결합. e, 웨스턴 블롯에 의해 평가된 바와 같은 점 돌연변이를 보유하는 hFGFR4-플래그 키메라 단백질에 대한 LD1의 결합. 돌연변이된 단백질을 전기영동시키고, LD1, 항-FGFR4 (8G11) 및 항-플래그 항체를 이용하여 순차적으로 이뮤노블롯팅시켰다. f, FGF19 (회색)에 결합된 FGFR4 (흑색 및 백색) 상의 G165 (흑색)의 위치를 보여주는 이량체 모델.

도 3: LD1은 FGFR4 활성을 억제한다. a, LD1은 고체 상 결합 검정에 의해 결정된 바와 같이 FGF1 및 FGF19에 대한 FGFR4 결합을 억제한다. b, LD1은 FGFR4/R1을 안정하게 발현하는 BaF3 세포의 FGF1-자극된 증식을 억제한다. c, LD1은 FGFR4를 안정하게 발현하는 L6 세포에서의 FGFR4 신호전달을 억제한다. d, LD1을 사용한 FACS 분석에 의해 결정된 바와 같은 간 종양 세포주의 하위세트에서의 FGFR4 단백질의 세포 표면 발현.

도 4: LD1은 간암 세포주에서 FGFR4 생물학적 활성을 억제한다. a, LD1은 웨스턴 블롯에 의해 평가된 바와 같이 HEP3B 세포에서 FGFR4 신호전달을 억제한다. b, LD1은 HEP3B 세포에서 FGFR4-조절된 CYP7α1 저해를 억제한다. CYP7α1 수준은 처리되지 않은 세포에서의 수준에 비한 발현 배수로 표현하였다. c, LD1은 간암 세포주의 패널에서 FGFR4-조절된 c-Fos 발현을 억제한다. 결과는 처리되지 않은 세포에서의 c-Fos 수준에 비한 발현 배수로 표현하였다. d, FGFR4 shRNA 독시시클린-유도성 벡터로 안정하게 형질감염된 JHH5 세포에서의 FGFR4 발현의 저해에 의한 콜로니 형성의 억제. e, LD1은 HCC 세포주 콜로니 형성을 억제한다. f, LD1-억제된 간암 세포주 콜로니 형성 목록. 값은 LD1이 첨가되지 않은 경우에 열거된 콜로니 수의 퍼센트로 표현하였다.

도 5: LD1의 생체내 효능. a, LD1은 마우스 간에서 FGF19-조절된 c-Fos 발현을 억제한다. 결과는 처리되지 않

은 마우스의 간에서의 c-Fos 수준에 비한 발현 배수로 표현하였다. b, LD1 (30 mg/kg; 매주 2회)은 생체내에서 HUH7 이종이식 종양 성장을 억제한다. c, 도 5b로부터의 HUH-7 이종이식 종양에서의 FGFR4, CYP7α1, c-Fos 및 egr-1의 mRNA 발현에 대한 LD1의 효과. d, 대조 항체로 처리된 DEN-가속된 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스 (상부 패널)의 간 표면으로부터 돌출된 다수의 크게 발생한 종양 (화살표). LD1로 처리된 DEN-가속된 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스 (하부 패널)의 간. e, 대조 항체, LD1, 또는 1A6 (항-FGF19 항체)로 처리된 DEN-가속된 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스의 간 중량.

도 6: FGFR4 발현은 암에서 탈조절된다. a, 위스커(Whisker)-박스 플롯은 바이오익스프레스(BioExpress) 데이터베이스의 mRNA 분석에 의해 결정된 바와 같은 인간 종양 및 정상 조직에서의 FGFR4 발현을 보여준다. 중심선은 중앙값을 나타내고; 박스는 제1 및 제3 사분위수 사이의 사분위간 범위를 나타낸다. "위스커"는 사분위간으로부터 극값의 위치로 연장된다. b, 유방 (X100 배율) 및 췌장 (X100 배율) 선암종, 및 간세포성 암종 (X200 배율 및 X400 배율)의 샘플에서의 FGFR4 면역염색. c, qRT-PCR에 의해 결정된 바와 같은 인간 정상 간 및 간 종양의 패널에서의 FGFR4 mRNA 발현. 각각의 샘플에 대한 값은 샘플 N1에서 관찰된 수준에 비한 발현 배수로 표현하였다.

도 7: 간암 세포주에서의 FGFR의 발현. a, qRT-PCR에 의해 결정된 바와 같은 간 종양 세포주의 패널에서의 FGFR4 mRNA 발현. 값은 JHH4 세포주에서의 FGFR1 수준에 비한 발현 배수로 표현하였다. b, 웨스턴 블롯에 의해 결정된 바와 같은 도 S1A에서와 동일한 세포주 패널에서의 FGFR4 단백질 발현.

도 8: LD1은 HUH7 세포에서 FGFR4 생물학적 활성을 억제한다. LD1은 HUH7 세포에서 FGFR4-조절된 CYP7α1 저해를 억제한다. CYP7α1 수준은 처리되지 않은 세포에서의 수준에 비한 발현 배수로 표현하였다.

도 9: LD1의 생체내 효능. LD1 (30 mg/kg)은 생체내에서 HUH7 이종이식 종양 성장을 억제한다. LD1의 항-종양 효능을 격주 방식으로 평가하였다.

도 10: 항-FGFR4의 마우스 및 인간화 변이체의 가변 도메인 서열. 마우스 LD1 및 인간화 변이체 hLD1.vB 및 hLD1.v22의 아미노산 서열을 트라스투주맙에 사용된 (a) 인간 카파 I (huKI) 및 (b) 인간 VH 하위군 III (huIII) 가변 도메인 프레임워크와 정렬시켰다. 차이는 점선 박스로 강조하고, 위치는 카바트에 따라 넘버링된다. 마우스 LD1로부터 인간 가변 카파 I 및 하위군 III 컨센서스 프레임워크로 이식된 초가변 영역은 서열, 구조 및 접촉 CDR 정의의 조합에 기초하여 선별하고 (문헌 [MacCallum RM et al., J of Molec Biol (1996); 262:732-45]), 박스 표시하였다. 경쇄 내의 3개의 버니어 위치를 변경하여 인간화 동안 친화도를 복구하고, 이들 위치는 표면 노출될 것으로 예상되지 않았다.

도 11: 항-FGFR4 항체 변이체의 약동학 및 분포. (a) FGFR4 ELISA를 이용한 FGFR4에 대한 chLD1 및 hLD1.vB의 결합의 비교. (b) CRL *nu/nu* 마우스의 HUH7 인간 간세포성 암종 이종이식 모델에서의 chLD1, hLD1.vB 및 비히클의 제16일 종양 부피의 비교. 항체를 30 mg/kg에서 매주 2회 투여하였다 (군당 10마리 마우스). 오직 chLD1만이 PBS 대조군에 비해 종양 성장을 감소시키는데 효과적인 반면 (p 값 = 0.014), hLD1.vB는 유의하게 효과적이지 않았다 (p 값 = 0.486). (c) chLD1 및 hLD1.vB의 약동학. NCR 누드 마우스에게 1 또는 20 mg/kg에서 IV 투여하고, 샘플을 FGFR4 ELISA를 이용하여 분석하였다. 유사한 결과를 IgG ELISA를 이용하여 수득하였다 (제시되지 않음). (d) NCR 누드 마우스에서의 ^{125}I-chLD1 및 ^{125}I-hLD1.vB의 조직 분포. 마우스에게 ^{125}I-chLD1 또는 ^{125}I-hLD1.vB를 투여하고, 조직 1 그램당 주사된 용량의 퍼센트 (%ID/g)를 방법에 기재된 바와 같이 투여 2시간 후에 결정하였다.

도 12: hLD1.vB와 마우스 C3d 사이의 상호작용의 확인. (a) PBS/BSA 또는 NCR 누드 마우스, 래트, 인간 및 시노몰구스 원숭이 혈장에서 48시간 동안 인큐베이션한 후의 chLD1 (빗금 막대) 및 hLD1.vB (백색 막대)의 검출. 회수율(퍼센트)을 FGFR4 ELISA를 이용하여 결정하였다. (b) ^{125}I-chLD1 (실선) 및 ^{125}I-hLD1.vB (파선)의 혈장 결합 분석. 트레이스는 오프-셋이고; 점은 150 kDa 피크의 위치를 나타낸다. 항체를 마우스 혈장에서 0 및 48시간 동안 인큐베이션한 후에 크기 배제 HPLC를 이용하여 분석하였다. PBS/BSA, 인간 혈장 또는 시노몰구스 원숭이 혈장에서의 인큐베이션은 도 15를 참조한다. 모든 인큐베이션에서 IgG에 상응하는 예상된 150 kDa에서의 피크가 생성되었다. 고분자량 피크는 오직 hLD1.vB를 함유하는 마우스 혈장 샘플에서만 관찰되었다. 초기 시점은 약 270 및 약 550 kDa에서 추가의 피크를 나타낸 반면, 48시간에서는 오직 270 kDa 피크만이 관찰되었다. 고분자량 피크는 hLD1.vB/마우스 혈장 인큐베이션을 pH 4에서 수행하였을 때 관찰되지 않았으며, 이는 이들 고분자량 피크의 존재가 pH 의존성임을 나타낸다 (도 15). (c) 마우스 혈장의 면역침전. chLD1 및 hLD1.vB를 마우스 혈장에서 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션하고, 크기-배제 HPLC에 의해 분석하였다. 이어서, 단백질-G

비드를 분획에 첨가한 후에 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 약 37 kDa에서의 밴드가 hLD1.vB/마우스 혈장 샘플 (레인 3)에 존재하는 270 kDa 피크에 상응하는 분획에서 검출되었으나, 시노몰구스 원숭이 또는 인간 혈장 또는 PBS/BSA로부터의 샘플에서는 그렇지 않았다 (도 15). 이 밴드는 마우스 혈장 단독 (레인 4) 또는 chLD1과 인큐베이션된 마우스 혈장 (레인 2)에서 관찰되지 않았다. 단백질 분자량 마커는 레인 1에서 전개시켰다. (d) hLD1.vB로의 면역침전으로부터 수득한 마우스 C3의 MS/MS 서열 적용범위. 마우스 C3에 대한 서열을 제시하고 (서열 38), C3d를 코딩하는 영역을 밑줄표시하였다. 확인된 펩티드는 다음과 같다:

DVPAADLSDQVPDTDSETRIILQGSPVVQMAEDAVDGER (서열 17)

RQEALELIKKGYTQQLAFK (서열 18)

AAFNNRPPSTWLTAYVVK (서열 19)

AANLIAIDSHVLCGAVK (서열 20)

QKPDGVFQEDGPVIHQEMIGGFR (서열 21)

EADVSLTAFVLIALQEARDICEGQVNSLPGSINKAGEYIEASYMNLQRPYTVAIAGY ALALMNK (서열 22)

WEEPDQQLYNVEATSY (서열 23)

YYGGGYGSTQATFMVFQALAQYQTDVPDHK (서열 24)

GTLSVVAVYHAK (서열 25)

DLELLASGVDR (서열 26)

NTLIIYLEK (서열 27).

도 13: C3d 결합이 결핍된 친화도 성숙 항-FGFR4 변이체. (a) NCR 누드, C3 야생형 (wt) 및 C3 ko 마우스 혈청에서 16시간 인큐베이션된 chLD1, hLD1.vB 및 hLD1.v22의 FGFR4 결합의 검출, 및 이후의 FGFR4 ELISA를 이용한 평가. 샘플을 PBS/0.5% BSA에서 인큐베이션된 동일한 샘플에 대해 정규화하였다. (b) hLD1.v22에 의한 마우스 C3d 면역침전의 결핍. chLD1 (레인 2), hLD1.vB (레인 3) 및 hLD1.v22 (레인 4)를 사용한 NCR 누드 마우스 혈장으로부터의 면역침전을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. ~37 kDa에서 밴드가 오직 hLD1.vB/마우스 혈장 샘플에서만 검출되었다. 단백질 분자량 마커는 레인 1에서 전개시켰다.

도 14: C3d 결합의 손실은 약동학 및 효능을 복구한다. (a) C3 wt 및 C3 ko 마우스에서의 chLD1 및 hLD1.vB의 약동학적 분석. 항체를 20 mg/kg에서 IV 투여하고; 이들의 혈중 농도를 FGFR4 ELISA를 이용하여 모니터링하였다. C3 k 마우스에서 hLD1.vB의 제거율은 C3 ko 및 C3 wt 마우스 둘 다에서 chLD1과 유사하다. (b) NCR 누드 마우스에서의 chLD1 hLD1.vB 및 hLD1.v22의 약동학적 분석. 항체를 20 mg/kg에서 IV 투여하고; 이들의 혈중 농도를 FGFR4 ELISA를 이용하여 모니터링하였다. hLD1.v22의 제거율은 chLD1과 유사하다. (c) CRL *nu/nu* 마우스의 HUH7 인간 HCC 이종이식 모델에서의 chLD1 hLD1.vB 및 hLD1.v22의 비교. 항체를 30 mg/kg에서 매주 투여하고 (군당 10마리 마우스), 종양 부피를 4주 동안 모니터링하였다. 제21일에서, chLD1 및 hLD1.v22 (각각, p 값 = 7×10^{-7} 및 3×10^{-5})는 PBS 대조군 (개방 사각형)에 비해 종양 성장을 감소시키는데 효과적인 반면, hLD1.vB는 단지 약간 효과적이였다 (p 값 = 0.011).

도 15: 시험관내 (a-b) 및 생체내 연구 (c) 샘플로부터의 혈장에서의 방사성-표지된 chLD1 및 hLD1.vB의 크기-배제 HPLC 분석. ^{125}I-hLD1.vB (a) 및 ^{125}I -chLD1 (b)을 PBS/BSA 또는 마우스, 인간 및 시노몰구스 원숭이 혈장에 첨가하고, 0 또는 48시간에서 크기-배제 HPLC에 의해 분석하였다. 모든 트레이스는 IgG에 대해 예상된 150 kDa에서의 피크 (우측 상의 피크)를 나타내었다. 약 270 (중앙 피크) 및 약 550 kDa (좌측 상의 피크)에서의 고분자량 피크는 오직 hLD1.vB를 함유하는 초기 마우스 혈장 샘플에서만 관찰되었으며; 48시간에서 오직 추가의 270 kDa 피크만이 관찰되었다. 이들 고분자량 피크는 pH 4.0의 마우스 혈장에서의 hLD1.vB에서 관찰되지 않았으며, 이는 고분자량 피크의 생성이 pH 의존성임을 나타낸다. 고분자량 피크는 시노몰구스 원숭이 또는 인간 혈장 또는 chLD1이 첨가된 임의의 혈장에서 검출되지 않았다; (C) 생체내 마우스 혈장 샘플. 마우스에게 chLD1에 대해 12.52 μCi/μg 및 hLD1.vB에 대해 9.99 μCi/ug의 비활성을 갖는 항체 ~0.1 mg/kg을 투여하였다. 혈청 샘플을 0.25, 2, 5, 24, 72 및 120시간에서 수집하였다. 모든 트레이스는 IgG에 대해 예상된 150 kDa에서의 피크 (우측 상의 피크)를 나타내었다. ~270 (중앙 피크) 및 ~550 kDa (좌측 상의 피크)에서의 고분자량 피크는 오직 hLD1.vB 혈청 샘플에서 관찰되었다. 고분자량 피크는 chLD1에서 관찰되지 않았다.

도 16: 면역침전 및 SDS-PAGE 분석. 항체를 혈장에서 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후에, 크기-배제 HPLC에 의해 분획화하였다. 단백질-G 비드를 고분자량 피크를 함유하는 크기 배제 HPLC 분획에 첨가하였다.

강하 샘플은 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. (a) 시험관내 래트 혈장; (b) 시험관내 시노몰구스 원숭이 혈장; (c) 시험관내 인간 혈장. ~37 kDa 단백질은 hLD1.vB와 인큐베이션된 래트 샘플에서 검출되었으나, 시노몰구스 원숭이 및 인간 샘플에서는 그렇지 않았다 (이들의 각각의 겔의 레인 4). ~37 kDa 단백질의 밴드는 어떠한 블랭크 혈장 (각각의 겔의 레인 2) 또는 chLD1 샘플 (각각의 겔의 레인 3)에서도 관찰되지 않았다. 단백질 분자량 마커는 레인 1에서 전개시켰다. (d) 생체내 마우스 혈장. 마우스에게 "방법"에 기재된 바와 같이 hLD1.vB 또는 chLD1을 투여하였다. 이어서, 단백질-G 비드를 투여 2시간 후의 시점으로부터 수집한 혈청 샘플에 첨가하고, SDS-PAGE에 의해 분석하였다. ~37 kDa의 밴드가 hLD1.vB (레인 3)에서 관찰되었으나, chLD1 혈청 샘플 (레인 2)에서는 그렇지 않았다. 단백질 분자량 마커는 레인 1에서 전개시켰다.

도 17: C3 wt 혈청, C3 ko 마우스 혈청 및 PBS/BSA에 첨가된 chLD1 및 hLD1.vB의 ELISA 검출. 항체를 밤새 혈청 또는 PBS/BSA 중에서 인큐베이션한 후에 ELISA에 의해 분석하였다. PBS/BSA에 비해, hLD1.vB는 C3 ko 마우스 혈청에서 완전히 회수되었으나, C3 wt 마우스 혈청에서는 그렇지 않았다. chLD1은 모든 매트릭스로부터 완전하게 회수되었다.

도 18: 진뱅크 등록 번호 AAB25788의 예시적인 인간 FGFR4 아미노산 서열을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] I. 정의

[0044] 본원의 목적을 위해 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같이 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0045] "친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 예시적 및 대표적 실시양태를 하기 기재한다.

[0046] "친화도 성숙" 항체는 항원에 대한 항체의 친화도를 개선하는 변경을 갖지 않는 부모 항체에 비해 하나 이상의 초가변 영역 (HVR) 내의 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭한다.

[0047] 항혈관신생제는 혈관 발생을 어느 정도 차단 또는 방해하는 화합물을 지칭한다. 항혈관신생제는 예를 들어 혈관신생 촉진에 관여하는 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 한 실시양태에서, 항혈관신생제는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 결합하는 항체, 예컨대 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)®)이다.

[0048] 용어 "항-FGFR4 항체" 및 "FGFR4에 결합하는 항체"는 항체가 FGFR4를 표적화하는데 있어 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 FGFR4에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 관련되지 않은 비-FGFR4 단백질에 대한 항-FGFR4 항체의 결합의 정도는 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이 FGFR4에 대한 상기 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, FGFR4에 결합하는 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM 또는 ≤ 0.001 nM (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 상이한 종으로부터의 FGFR4 사이에 보존된 FGFR4의 에피토프에 결합한다.

[0049] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 항체 구조를 포함한다.

[0050] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 일부를 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편들로 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0051] 참조 항체로서 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 50% 이상 차단하는 항체, 및 반대로 경쟁 검정에서 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 50% 이상 차단하는 참조 항체를 지칭한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "FGFR4"는 달리 나타내지 않는 한 영장류 (예를 들어, 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 FGFR4를 지칭한다. 용어는 "전장" 비프로세싱된 FGFR4 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 형태의 FGFR4를 포함한다. 용어는 또한 FGFR4의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 예시적인 인간 FGFR4의 아미노산 서열은 도 18에 제시되어 있다.

[0053] "FGFR4 활성화"는 FGFR4 수용체의 활성화 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로, FGFR4 활성화는 신호 전달 (예를 들어, FGFR4 또는 기질 폴리펩티드 내의 티로신 잔기를 인산화시키는 FGFR4 수용체의 세포내 키나제 도메인에 의해 유발됨)을 일으킨다. FGFR4 활성화는 관심 FGFR4 수용체에 대한 FGFR4 리간드 (Gas6) 결합에 의해 매개될 수 있다. FGFR4에 대한 Gas6 결합은 FGFR4의 키나제 도메인을 활성화시키고, 이에 의해 FGFR4에서의 티로신 잔기의 인산화 및/또는 추가의 기질 폴리펩티드(들)에서의 티로신 잔기의 인산화가 일어날 수 있다.

[0054] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포성암, 위장암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁 내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 장애, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0055] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0056] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)®); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민 포함); 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCAMTIN)®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아마이신, 특히 칼리케아마이신 감마1I 및 칼리케아마이신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 디네미신 (디네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사(독실(DOXIL)®), 리포솜 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOCET)®), PEG화 리포솜 독소루비신 (케릭스(CAELYX)®) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토

니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토트렉세이트, 겜시타빈 (겜자르(GEMZAR)®), 테가푸르(유프토랄(UFTORAL)®), 카페시타빈(젤로다(XELODA)®), 에포틸론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 오레곤주 유진)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라큐린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®); 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)™), 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 메토트렉세이트; 백금 작용제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)®) 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®), 빈데신 (엘디신®, 필데신®), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®)을 포함하여, 튜불린 중합이 미세관을 형성하는 것을 방지하는 빈카; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산 (벡사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®) 포함); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)®); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트(SUTENT)®, 화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); 보르테조밉 (벨케이드(VELCADE)®); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리메르센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)®); 픽산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제(하기 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파뮨(RAPAMUNE)®); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)™); 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴™)을 이용한 치료 요법에 대한 약어)를 포함한다.

[0057] 본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬 작용제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이들은 혼합된 효능제/길항제 프로파일을 갖는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)®), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)®), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예컨대 SERM3; 효능제 특성을 갖지 않는 순수한 항에스트로겐, 예컨대 풀베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)®) 및 EM800 (이러한 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 턴오버를 증가시키고/거나 ER 수준을 저해할 수 있음); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®) 및 아미노글루테티미드, 및 다른 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®),

메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체화 호르몬-방출 호르몬 효능제, 예를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)®, 고세렐린, 부세렐린 및 트립테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스틴, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸스틸베스트롤 및 프레마린, 및 안드로겐/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든 트랜스 레티온산 및 펜레티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 호르몬 그 자체일 수 있다.

[0058] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 다른 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.

[0059] 항체의 "클래스"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5종의 주요 클래스의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지칭된다.

[0060] 용어 "세포증식억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 성장을 정지시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 세포증식억제제는 S 기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 세포증식억제제의 추가의 예는 G0/G1 정지 또는 M-기 정지를 유도함으로써 세포 주기 진행을 차단하는 작용제를 포함한다. 인간화 항-Her2 항체 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®)은 G0/G1 정지를 유도하는 세포증식억제제의 예이다. 전통적인 M-기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 특정 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S-기 정지로 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), 예를 들어 p. 13]에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목 나무로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테레®, 롱-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔®, 브리스톨-마이어스 스퀍(Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 일으킨다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "세포독성제"는 세포 기능의 억제 또는 저해 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제 또는 약물 (예를 들어, 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제); 성장 억제제; 효소 및 그의 단편, 예컨대 뉴클레오티드분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함); 및 하기 개시되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0062] "FGFR4 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR4를 발현 (과다발현 포함)하고/하거나, FGFR4 유전자를 증폭시키고/시키거나 다르게는 FGFR4의 활성화 또는 인산화를 나타내는 것이다.

[0063] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0064] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 지칭한다.

[0065] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간

IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 신장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0066] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 하기 FR 도메인으로 이루어진다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0067] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 교환가능하게 사용되며, 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에서 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0068] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 일차 형질전환된 세포 및 계대배양 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 부모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있으나, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝 또는 선택되는 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.

[0069] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하여 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 배제된다.

[0070] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.

[0071] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 실질적으로 1개 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3)에서 발생한다. (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)].) 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)].) VH 내의 CDR1을 제외하고는, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR, 또는 a-CDR로 지칭되는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조.) 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0073] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 이종 분자(들)에 접합된 항체이다.

[0074] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0075] "세포 성장 또는 증식을 억제하는"은 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 감소시키는 것을 의미하고, 세포 사멸의 유도를 포함한다.

[0076] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분에서 분리된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정된 바와 같이 95% 또는 99% 초과의 순도로 정제한다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.

[0077] "단리된" 핵산은 그의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유되는 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0078] "항-FGFR4 항체를 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 (단일 벡터 또는 별도의 벡터 내의 이러한 분자(들) 및 숙주 세포에서 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들) 포함)를 지칭한다.

[0079] 본원에 사용된 본 발명의 항체에 대한 어구 "결합이 거의 없는 내지 전혀 없는"은 항체가 생물학적으로 의미있는 양의 결합을 나타내지 않음을 의미한다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, 활성의 양은 본 발명의 항체와 참조 대응물 사이에 비교가 행해질 수 있는 한, 정량적으로 또는 정성적으로 결정될 수 있다. 활성은 예를 들어 본원에 기재된 것을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 검정 또는 기술에 따라 측정되거나 검출될 수 있다. 본 발명의 항체 및 그의 참조 대응물에 대한 활성의 양은 병행 또는 별도의 진행으로 결정될 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하기 위해 사용되고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고는 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조할 수 있고, 이러한 방법 및 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 예시적인 방법이 본원에 기재된다.

[0081] "네이키드 항체"는 이종 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 네이키드 항체는 제약 제제에 존재할 수 있다.

[0082] "천연 항체"는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디술피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) (또한 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) (또한 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 2가지 유형 중 하나로 할당될 수 있다.

[0083] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기사항, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 대한 경고에 대한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 지칭하기 위해 사용된다.

[0084] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는 서열을 정렬시키고 필요한 경우에는 최대 서열 동일성 퍼센트 달성을 위해 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않으면서

참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 시스템에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0085] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0086] X/Y의 분율 x 100

[0087] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 상기 단락에 기재한 바와 같이 수득한다.

[0088] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 형태로 존재하며, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0089] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 다른 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0090] 본원에 사용된 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상적 개입을 지칭하고, 임상 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 질행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 호전, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해 사용된다.

[0091] 용어 "종양"은 악성이든 또는 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 지칭된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0092] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에 대한 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "벡터"는 그 벡터가 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 벡터 뿐만 아니라 벡터가 그 내부로 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 그 벡터가 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다.

이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.

[0094] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 하기 서열 각각의 적어도 일부 또는 모두를 포함한다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 13)-H1-WVRQAPGKGLEWV (서열 14)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 15)-H3-WGQGTLVTVSS (서열 16).

[0095] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 하기 서열 각각의 적어도 일부 또는 모두를 포함한다:

[0096] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 28)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (서열 29)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 30)-L3-FGQGTKVEIK (서열 31).

[0097] 용어 "소모성" 장애 (예를 들어, 소모성 증후군, 악액질, 근육감소증)는 바람직하지 않고/거나 건강에 해로운 체중 손실 또는 체 세포 질량 손실에 의해 유발되는 장애를 지칭한다. 노년층 뿐만 아니라 AIDS 및 암 환자에서, 소모성 질환은 지방 및 제지방 저장소 둘 모두를 포함해서 바람직하지 않은 체중 감소를 야기할 수 있다. 소모성 질환은 식품의 불충분한 섭취 및/또는 질병 및/또는 노화 과정과 관련된 대사 변화의 결과일 수 있다. 암 환자 및 AIDS 환자, 뿐만 아니라 큰 수술 이후의 환자 또는 만성 감염, 면역 질환, 갑상선기능항진증, 크론병, 심인성 질환, 만성 심부전 또는 다른 심각한 외상을 갖는 환자는 때때로 악액질, 대사 및 때로는 섭식 장애라고도 불리는 소모성 질환으로 빈번하게 고통받는다. 악액질은 부가적으로 대사과다증 및 이화과다증을 특징으로 한다. 악액질 및 소모성 질환은 소모성 상태를 지칭하는데 교환 가능하게 빈번히 사용되지만, 악액질을 제지방 체중 손실, 및 특히 체세포 질량 손실로서 소모성 증후군과 구분짓는 적어도 하나의 연구 실체가 존재한다 (문헌 [Mayer, 1999, J. Nutr. 129(1S Suppl.):256S-259S]). 연로한 개체에게 영향을 미칠 수 있는 또 다른 이같은 장애인 근육감소증은 전형적으로 근육 질량 손실을 특징으로 한다. 상기한 바와 같은 최종 단계의 소모성 질환은 악액질 또는 근육감소증을 앓는 개체에서 발달할 수 있다.

[0098] **II. 조성물 및 방법**

[0099] 한 측면에서, 본 발명은 부분적으로 다양한 FGFR4 결합제 (예컨대, 항체 및 그의 단편)의 확인을 기초로 한다. 특정 실시양태에서, FGFR4에 결합하는 항체가 제공된다. 본 발명의 항체는 예를 들어 암, 간 질환 및 소모성 질환의 진단 또는 치료에 유용하다.

[0100] **A. 예시적인 항-FGFR4 항체**

[0101] 한 측면에서, 본 발명은 FGFR4에 결합하는 단리된 항체를 제공한다.

[0102] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR4에 ≤ 0.05 nM의 친화도로 결합한다.

[0103] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 마우스 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합한다.

[0104] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 시노몰구스 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합한다.

[0105] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간, 마우스 및 시노몰구스 FGFR4에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합한다.

[0106] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR1, 인간 FGFR2 및/또는 인간 FGFR3에 실질적으로 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간 FGFR1, 인간 FGFR2 및/또는 인간 FGFR3에 거의 또는 전혀 결합하지 않는다.

[0107] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 마우스 C3 단백질 (일부 실시양태에서, 도 12d에 제시된 아미노산 서열을 갖는 마우스 C3 단백질)에 실질적으로 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는마우스 C3 단백질 (일부 실시양태에서, 도 12d에 제시된 아미노산 서열을 갖는 마우스 C3 단백질)에 거의 또는 전혀 결합하지 않는다.

[0108] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간화 항-FGFR4 항체이고, 여기서 인간 FGFR4에 대한 항체의 1가 친화도는 각각 서열 8 및 7에 도시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함하는 뮤린 항체의 1가 친화도와 실질적으로 동일하다. 일부 실시양태에서, 항 FGFR4 항체는 인간화 및 친화도 성숙 항체이다.

[0109] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGFR4 활성의 길항제이다.

[0110] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGFR4에 대한 FGF 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, FGFR4에 대한 FGF1 및/또는 FGF19 결합이 억제된다. 일부 실시양태에서, FGFR4에 대한 FGF1 결합의 억제에 대한 IC50은 약 0.10 nM이다. 일부 실시양태에서, FGFR4에 대한 FGF19 결합의 억제에 대한 IC50은 약 0.10 nM이다.

[0111] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 세포 증식을 억제한다. 일부 실시양태에서, 증식은 FGF-유도된 세포 증식이다. 일부 실시양태에서, 세포 증식은 BAF3/FGFR4 트랜스제닉 세포 증식이다.

[0112] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGFR4를 발현하는 세포의 FGF (예를 들어, FGF1) 자극된 증식을 억제한다. 일부 실시양태에서, 세포는 HUH7 세포이다.

[0113] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGF19에 노출된 세포에서 CYP7α7 발현의 FGF19-매개된 억제를 억제한다.

[0114] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGF19에 노출된 세포에서 FGFR4, MAPK, FRS2 및/또는 ERK2의 FGF19-유도된 인산화를 억제한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGF19-유도된 콜로니 형성을 억제한다. 일부 실시양태에서, 콜로니 형성은 HCC 세포주 콜로니 형성이다. 일부 실시양태에서, HCC 세포주는 JHH5이다.

[0116] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 변성된 FGFR4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 환원되고 변성된 FGFR4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 환원된, 변성된 FGFR4의 결합은 웨스턴 블롯을 이용하여 검정된다.

[0117] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 세포 표면에서 발현된 FGFR4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포는 HUH7 또는 JHH5 세포이다.

[0118] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 G165A 돌연변이를 포함하는 인간 FGFR4에 유의하게 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 G165A 돌연변이를 포함하는 인간 FGFR4에 거의 또는 전혀 결합하지 않는다.

[0119] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 150 내지 170을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 145 내지 180을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 폴리펩티드에 결합한다.

[0120] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 150 내지 170을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 성숙한 인간 FGFR4 아미노산 서열의 아미노산 번호 145-180을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나 또는 이들로 이루어진 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 폴리펩티드에 결합한다.

[0121] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGFR4 이량체화를 억제한다.

[0122] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 FGFR4 이량체화 인터페이스에서 결합하는이다.

[0123] 특정 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 종양 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, 종양 성장은 간 종양 성장이다.

[0124] 한 측면에서, 본 발명은 (a) NHWMN (서열 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) MILPVDSETTLEQKFKD (서열 2)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) GDISLFDY (서열 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RTSQDISNFLN (서열 4)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) YTSRLHS (서열 5)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGNALPYT (서열 6)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-FGFR4 항체를 제공한다.

[0125] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 및 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 2의 아미노산 서

열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0126] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0127] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 (a) (i) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열 3으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0128] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 6으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.

[0129] 또 다른 측면에서, 항-FGFR4 항체는 하기 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다:

[0130] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNHWMNWVRQAPGKGLEWVGMILPVDSETTLEQKFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGDISLFDYWGQGTLVTVSS (서열 7). 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열과 관련하여 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 서열을 포함하는 항-FGFR4 항체는 FGFR4에 결합하는 능력을 유지한다. 특정 실시양태에서, 서열 7에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-FGFR4 항체는 서열 7에서의 VH 서열을 포함한다 (이 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0131] 또 다른 측면에서, 하기 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-FGFR4 항체가 제공된다:

[0132] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDISNFLNWYQQKPGKAFKILISYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNALPYTFGQGTKVEIKR (서열 8). 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 서열을 포함하는 항-FGFR4 항체는 FGFR4에 결합하는 능력을 유지한다. 특정 실시양태에서, 서열 8에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-FGFR4 항체는 서열 8에서의 VL 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0133] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-FGFR4 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 7 및 서열 8의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).

[0134] 임의의 상기 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 인간화 항체이다. 한 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같이 HVR을 포함하고, 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 추가로 포함한다. 본 발명의 항체는 FGFR4에 대한 결합 활성이 실질적으로 유지되는 한 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 본 발명의 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위

치 71은 A이고/거나 73은 T이고/거나 78은 A이다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (헤르셉틴®, 제넨테크, 인크., 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) (또한, 미국 특허 번호 6,407,213 & 5,821,337, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에서 언급됨)의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 프레임워크 서열은 하기 수용자 인간 프레임워크를 포함한다: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 9)-L1-WYQQKPGKAFKILIS (서열 10)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 11)-L3-FGQGTKVEIK (서열 12).

[0135] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-FGFR4 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-FGFR4 항체를 제공한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 서열 7의 VH 서열 및 서열 8의 VL 서열을 포함하는 항-FGFR4 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 도 18 (서열 39)에 제시된 서열의 아미노산 번호 145-180으로 이루어진 FGFR4의 단편 내의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

[0136] 추가 측면에서, 본 발명은 인간 FGFR4에 대한 결합에 대해 서열 7의 VH 서열 및 서열 8의 VL 서열을 포함하는 항-FGFR4 항체와 경쟁하는 항-FGFR4 항체를 제공한다.

[0137] 본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-FGFR4 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 항체 단편, 예를 들어, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 $F(ab')_2$ 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 전장 항체, 예를 들어 무손상 IgG1 항체, 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 클래스 또는 이소형이다.

[0138] 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-FGFR4 항체는 하기 섹션 1-7에 기재된 바와 같은 임의의 특징으로 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:

[0139] *1. 항체 친화도*

[0140] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM 또는 ≤ 0.001 nM (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.

[0141] 한 실시양태에서, Kd는 하기 검정에 기재된 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 Fab를 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원과 평형화시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μg/ml의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23℃)에서 차단하였다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20®)으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl/웰의 섬광제 (마이크로신트-20(MICROSCINT-20)™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드)로 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다.

[0142] 또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 예를 들어 ~10의 반응 단위 (RU)로 고정화된 항원 CM5 칩을 사용하여 25℃에서 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 μg/ml (~0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 μl/분의 유량으로 주사한다. 항원 주사 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl/분의 유량으로 25℃에서

0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주사한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on}의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면-플라즈몬 공명 검정에 의한 회합률이 10^6 M^{-1} s^{-1}을 초과하는 경우, 회합률은 분광측정계, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠 (Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(SLM-AMINCO)™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0143] *2. 항체 단편*

[0144] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 다른 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌 [Pluckthuen, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)]; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 샐비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편의 논의에 대해, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0145] 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0146] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 월섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0147] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같은 무손상 항체의 단백질분해적 소화 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 파지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0148] *3. 키메라 및 인간화 항체*

[0149] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 클래스 또는 서브클래스가 부모 항체의 것으로부터 변화된 "클래스 스위칭" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0150] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 부모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성이 감소하도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0151] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되었고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 그라프팅 기재); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("리서페이싱" 기재); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 셔

플링" 기재); 및 [Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 셔플링에 대한 "가이드 선택" 접근법 기재)에 추가로 기재되어 있다.

[0152] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0153] *4. 인간 항체*

[0154] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0155] 인간 항체는 항원 접종에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 로커스를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 로커스는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 (제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술 기재); 미국 특허 번호 5,770,429 (HuMab® 기술 기재); 미국 특허 번호 7,041,870 (K-M 마우스(K-M MOUSE)® 기술 기재), 및 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900 (벨로시마우스(VelociMouse)® 기술 기재)을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0156] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조.) 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0157] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기 기재된다.

[0158] *5. 라이브러리-유래 항체*

[0159] 본 발명의 항체는 원하는 활성을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특성을 갖는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에서 검토되고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

[0160] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위적으로 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하고 있는 특허 공보는 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0161] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 여겨진다.

[0162] *6. 다중특이적 항체*

[0163] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 FGFR4에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 FGFR4의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 FGFR4를 발현하는 세포에 세포독성제를 위치시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0164] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))], WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "노브-인-홀(knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스티어링 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생산하기 위한 류신 지퍼의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (예를 들어, 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같은 삼중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다

[0165] "옥토퍼스 항체"를 포함하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0166] 본원의 항체 또는 단편은 또한 FGFR4 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0167] *7. 항체 변이체*

[0168] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유하도록, 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다.

[0169] a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0170] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "보존적 치환"의 표제 하에 표 1에 제시된다. 보다 더 실질적인 변화는 "예시적인 치환"의 표제 하의 표 1에 아미노산 측쇄 클래스에 관하여 하기 추가로 기재된 바와 같이 제공된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입되고, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0171] <표 1>

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0172]

[0173] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0174] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0175] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0176] (3) 산성: Asp, Glu;

[0177] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0178] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0179] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0180] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0181] 치환 변이체의 한 가지 유형은 부모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 부모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 상승된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 부모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 이용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이화되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0182] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은

HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008] 참조), 및/또는 SDR (a-CDR) 동안 결합 친화도에 대해 시험된 생성된 변이체 VH 또는 VL로 높은 빈도에서 돌연변이화를 수행하는 코돈에 의해 코딩되는 잔기에서 이루어질 수 있다. 이차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의한 친화도 성숙은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쇄 셔플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 이차 라이브러리를 생성한다. 이어서, 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인하게 위해 라이브러리를 스크리닝한다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 HVR-유도된 접근법과 연관되며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합과 연관된 HVR 잔기는 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0183] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0184] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 지칭된다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지의 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 원하는 특성을 함유하는지의 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0185] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0186] b) <u>글리코실화 변이체</u>

[0187] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0188] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.

[0189] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결핍된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)의 합에 비해 Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균적인 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 나타내지만; Asn297은 또한 항체의 부가적 서열 변이에 의해 위치 297의 약 ±3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화

변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫꼬 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특히 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0190] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이중 안테나 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 푸코실화가 감소될 수 있고/거나 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 1개 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0191] c) <u>Fc 영역 변이체</u>

[0192] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0193] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 몇몇 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 FcγR 결합이 결핍되어 있지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 결핍될 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 번호 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 및 Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)™ 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토톡스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 결핍되었는지를 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 제거율/반감기 결정은 또한 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0194] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297

및 327 중 2개 이상에 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).

[0195] FcR에 대해 개선되거나 또는 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재된다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)

[0196] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0197] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0198] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합을 갖는 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).

[0199] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.

[0200] d) <u>시스테인 조작된 항체 변이체</u>

[0201] 특정 실시양태에서, 항체의 1개 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오MAb"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올 기가 항체의 접근가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 이용하여 항체를 본원에 추가로 기재한 바와 같이 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 1개 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0202] e) <u>항체 유도체</u>

[0203] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되고 쉽게 입수가능한 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다.

[0204] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0205] B. 재조합 방법 및 조성물

[0206] 항체는 재조합 방법 및 조성물을 이용하여, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-FGFR4 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 한 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다 (예를 들어, 이들로 형질감염됨). 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기에 제공된 바와 같은 항-FGFR4 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것, 및 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 임의로 회수하는 것을 포함하는 항-FGFR4 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0207] 항-FGFR4 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 단리하고 서열분석할 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 것에 의함).

[0208] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. (또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참조.) 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.

[0209] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 항체를 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴으로 생산되게 하는, 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 숙주 발현에 적합하다. 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.

[0210] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바큘로바이러스 균주가 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다 (Spodoptera frugiperda) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 것으로 확인되어 있다.

[0211] 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)™ 기술을 기재함)를 참조한다.

[0212] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 $DHFR^-$ CHO 세포 (문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

[0213] C. 검정

[0214] 본원에 제공된 항-FGFR4 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 스크리닝되거나, 또는 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성화될 수 있다.

[0215] *1. 결합 검정 및 기타 검정*

[0216] 한 측면에서, 본 발명의 항체를 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법으로 그의 항원 결합 활성에 대해 시험한다.

[0217] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정은 FGFR4에 대한 결합에 대해 항체 LD1과 경쟁하는 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 항체 LD1에 의해 결합된 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 상세한 예시적인 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제공된다.

[0218] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 FGFR4를 FGFR4에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 항체 LD1) 및 FGFR4에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 능력에 대해 시험할 제2 표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 FGFR4를 제1 표지된 항체를 포함하고 제2 비표지된 항체를 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션한다. FGFR4에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 잉여량의 미결합 항체를 제거하고, 고정화된 FGFR4과 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정화된 FGFR4과 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이것은 제2 항체가 FGFR4에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.

[0219] *2. 활성 검정*

[0220] 한 측면에서, 검정은 생물학적 활성을 갖는 그의 항-FGFR4 항체를 확인하기 위해 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 FGFR4를 발현하는 세포 (예를 들어, HUH7 세포)의 FGF (예를 들어, FGF1) 자극된 증식, FGF19에 노출된 세포에서 CYP7α7 발현의 FGF19-매개된 억제, FGF19에 노출된 세포에서 FGFR4, MAPK, FRS2 및/또는 ERK2의 FGF19-유도된 인산화, 및 FGF19-유도된 콜로니 형성 (일부 실시양태에서, HCC 세포주 콜로니 형성)의 억제를 포함할 수 있다.

[0221] 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체가 또한 제공된다.

[0222] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다. 이러한 생물학적 활성을 시험하기 위한 검정이 본원에 기재된다.

[0223] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 성장 또는 증식의 억제에 대한 검정은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본원에 기재된 "세포 사멸" 검정에 의해 예시되는 세포 증식에 대한 특정 검정은 세포 생존율을 측정한다. 한 이러한 검정은 프로메가 (위스콘신주 매디슨)으로부터 상업적으로 입수가능한 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)™ 발광 세포 생존율 검정이다. 상기 검정은 대사 활성인 세포의 지표인 ATP 존재량의 정량화를 기초로 하여 배양물 중 생존 세포의 수를 측정한다. 문헌 [Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특허 번호 6602677을 참조한다. 검정은 자동화된 고처리량 스크리닝 (HTS)에 적용가능한 96웰 또는 384웰 포맷으로 수행될 수 있다. 문헌 [Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404]을 참조한다. 검정 절차는 단일 시약 (셀타이터-글로® 시약)을 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 포함한다. 이로 인해 세포 용해가 일어나고, 발광 신호의 발생이 루시페라제 반응에 의해 생성된다. 발광 신호는 배양물 중에 존재하는 생존 세포 수에 정비례하는 ATP 존재량에 비례한다. 데이터는 광도계측기 또는 CCD 카메라 영상화 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 결과는 상대적인 광 단위 (RLU)로 표현된다.

[0224] 세포 증식에 대한 또 다른 검정은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 검정인 "MTT" 검정이다. 셀타이터-글로™ 검정과 마찬가지로, 본 검정은 세포 배양액 내에 존재하는 대사적으로 활성인 세포의 수를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, 및 Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882]을 참조한다.

[0225] 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 FGFR4를 발현하거나 또는 FGFR4를 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 이러한 세포는 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 FGFR4를 과다발현하는 종양 세포를 포함한다. 이러한 세포는 또한 FGFR4를 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함) 및 정상적으로 FGFR4를 발현하지 않지만 FGFR4를 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다. 시험관내 검정에서 상기 한 것 중 임의의 것에 사용하기 위한 본원에 제공된 예시적인 세포주는 HCC 세포주 HUH7을 포함한다.

[0226] 한 측면에서, 그의 항-FGFR4 항체는 생체내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 그의 항-FGFR4 항체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 생체내 모델 시스템, 예컨대 이종이식 모델은 이러한 시험에 이용될 수 있다. 예시적인 이종이식 시스템에서, 인간 종양 세포는 적합하게는 면역손상된 비-인간 동물, 예를 들어, 무흉선 "누드" 마우스에 도입된다. 본 발명의 항체는 동물에 투여된다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체의 능력이 측정된다. 상기 이종이식 시스템의 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이러한 이종이식 모델은 온코테스트 게엠베하(Oncotest GmbH) (독일 프라이베르그)로부터 상업적으로 입수가능하다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 종양 세포주, 예컨대 HUH7 HCC 종양 세포주로부터의 세포이다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 또는 적절한 부위, 예컨대 유방 지방 패드로의 이식에 의해 적합하게 면역손상된 비-인간 동물에 도입된다. 특정 실시양태에서, 이종이식 모델은 예를 들어 본원 및 문헌 [nicholes et al., Am J Pathol 160:2295-2307]에 기재된 바와 같은 FGF19를 과다발현하는 트랜스제닉 마우스이다.

[0227] 임의의 상기 검정이 항-FGFR4 항체를 대신하여 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0228] 임의의 상기 검정이 항-FGFR4 항체 및 추가의 치료제, 예컨대 화학요법제를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0229] **D. 면역접합체**

[0230] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-FGFR4 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0231] 한 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588, 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); 및 Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579); 메토트렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하지만 이에 제한되지는 않은 하나 이상 약물에 접합된 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0232] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 효소 활성 독소 또는 그의 단편 (디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사 (Pseudomonas aeruginosa)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 (Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다.

[0233] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵

자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 다시 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0234] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 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 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오티드를 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0235] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 상업적으로 입수가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.; 미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교-링커 시약 (BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하나 이에 제한되지는 않음)으로 제조된 이러한 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다.

[0236] **E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물**

[0237] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-FGFR4 항체는 생물학적 샘플에서FGFR4의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직, 예컨대 유방, 췌장, 식도, 폐 및/또는 뇌를 포함한다.

[0238] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 FGFR4의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 항-FGFR4 항체와 생물학적 샘플을 FGFR4에 대한 항-FGFR4 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 접촉시키는 것, 및 항-FGFR4 항체와 FGFR4 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-FGFR4 항체는 예를 들어 FGFR4이 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 항-FGFR4 항체를 사용하는 요법에 적격인 대상체를 선택하는데 사용된다.

[0239] 본 발명의 항체를 이용하여 진단될 수 있는 예시적인 장애는 암 (예를 들어, 유방, 폐, 췌장, 뇌, 신장, 난소, 위, 백혈병, 자궁 내막, 결장, 전립선, 뇌하수체, 유방 섬유선종, 두경부, 연부 조직, 신경모세포종, 흑색종, 자궁 내막, 고환, 담관암종, 담낭 및 간의 암)를 포함한다.

[0240] 특정 실시양태에서, 표지된 항-FGFR4 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 발색, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지) 뿐만 아니라 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 표지는 방사성동위원소 ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H 및 ^{131}I, 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 또는 루시페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0241] **F. 제약 제제**

[0242] 본원에 기재된 바와 같은 항-FGFR4 항체의 제약 제제는 원하는 정도의 순도를 갖는 상기 항체를 하나 이상의 임의의 제약상 허용되는 담체 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 제약상 허용되는 담체는 사용되는 투여량

및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는, 특정 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0243] 예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 WO2006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0244] 또한, 본원에서 제제는 치료되는 특정한 적응증에 필요한 하나 초과의 활성 성분, 바람직하게는 서로 유래한 영향을 주지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, EGFR 길항제 (예컨대, 에를로티닙), 항혈관신생제 (예컨대, VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체) 또는 화학요법제 (예컨대, 탁소이드 또는 백금 작용제)를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0245] 활성 성분은 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀젼에서 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0246] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0247] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성할 수 있다.

[0248] **G. 치료 방법 및 조성물**

[0249] 본원에 제공된 임의의 항-FGFR4 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0250] 한 측면에서, 의약으로 사용하기 위한 항-FGFR4 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 암의 치료에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 간 질환 (예를 들어, 간경변증을)의 치료에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 소모성 장애의 치료에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 암을 앓는 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하는 것을 포함하는 상기 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 간 장애 (예컨대 간경변증)를 앓는 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하는 것을 포함하는 상기 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체를 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 세포 증식의 억제에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하여 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 개체에서의 세포 증식 억제 방법에 사용하기 위한 항-FGFR4 항체를 제공한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다.

[0251] 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제작 또는 제조에 있어서 항-FGFR4 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 암의 치료를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 암을 앓는 개체에게 유효량의 의약을 투여하

는 것을 포함하는 암의 치료 방법에 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서, 의약은 간 장애 (예컨대, 간경변증, 비-알콜성 지방간 질환, 담즙성 간경변증, 경화성 담관염, 진행성 가족성 간내 담즙정체)의 치료를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 간 장애 (예컨대, 간경변증, 비-알콜성 지방간 질환, 담즙성 간경변증, 경화성 담관염, 진행성 가족성 간내 담즙정체)를 앓는 개체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는 상기 간 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 것이다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 의약은 세포 증식을 억제하기 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 개체에게 유효량의 의약을 투여하여 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 개체에서의 세포 증식 억제 방법에 사용하기 위한 것이다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0252] 추가 측면에서, 본 발명은 암의 치료 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 이러한 암을 앓는 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0253] 추가 측면에서, 본 발명은 간 장애 (예컨대 간경변증, 비-알콜성 지방간 질환, 담즙성 간경변증, 경화성 담관염, 진행성 가족성 간내 담즙정체)의 치료 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 이러한 간 장애를 앓는 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0254] 추가 측면에서, 본 발명은 소모성 장애의 치료 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 이러한 소모성 장애를 앓는 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0255] 추가 측면에서, 본 발명은 개체에서 세포 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 개체에게 유효량의 항-FGFR4 항체를 투여하여 세포 증식을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, "개체"는 인간이다.

[0256] 추가 측면에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위한, 본원에 제공된 임의의 항-FGFR4 항체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-FGFR4 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-FGFR4 항체 및 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제를 포함한다.

[0257] 본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 기타 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 하나 이상의 추가의 치료제와 공동-투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제이다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 항혈관신생제이다.

[0258] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제가 동일한 또는 별도의 제제에 포함됨), 및 개별 투여를 포함하고, 이 경우에 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법과 조합되어 사용될 수도 있다.

[0259] 본 발명의 항체 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하여 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 다양한 투여 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0260] 본 발명의 항체는 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료할 특정한 장애, 치료할 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 해당 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른

인자에 따라 달라진다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0261] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로, 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합하여 사용되는 경우)은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해서든 아니면 연속 주입에 의해서든지 상관없이, 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 초과의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상의 원하는 저해가 일어날 때까지 지속될 것이다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 매 3주마다 투여될 수 있다 (예를 들어, 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체가 환자에게 제공되도록 투여됨). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0262] 임의의 상기 제제 또는 치료 방법은 항-FGFR4 항체 대신에 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 이용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0263] **H. 제조품**

[0264] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 조성물 자체를 수용하거나 또는 상기 조성물을 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또 다른 조성물과 조합하여 수용하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥 주사액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 하나 이상의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에, 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 함유하는 제1 용기; 및 (b) 그 내부에, 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물을 함유하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서의 제조품은, 조성물이 특정한 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정박테리아 주사용수 (BWFI), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0265] 임의의 상기 제조품이 항-FGFR4 항체 대신에 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0266] **III. 실시예**

[0267] **A. 항-FGFR4 항체로의 처리는 간세포성 암종을 억제하였다**

[0268] **물질 및 방법**

[0269] *인 실리코 발현 분석.* 발현 분석을 위해, 바이오익스프레스™ 데이터베이스 (진 로직(Gene Logic), 메릴랜드주 게이더스버그)로부터 추출된 정규화된 유전자 발현 데이터로 FGFR4에 대한 박스- 및 위스커-플롯을 생성하였다. 정상 및 암 조직에서의 FGFR4 발현의 분포를 프로브 204579_at와 연관된 신호를 이용하여 평가하였다.

[0270] *면역조직화학.* 포르말린-고정된 파라핀-포매 조직 절편을 항원 회수를 위해 트릴로지(Trilogy) (셀 마쿠(Cell Marque), 캘리포니아주 로클린)를 이용하여 처리한 후에, 10 μg/ml 항-FGFR4 항체 (8G11; 제넨테크, 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)와 인큐베이션하였다. 면역염색은 비오티닐화 2차 항체, ABC-HRP 시약 (벡터 래보러토리즈(Vector Laboratories), 캘리포니아주 벌링게임), 및 금속-증진된 DAB 비색 퍼옥시다제 기질 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 일리노이주 록포드)을 사용하여 달성하였다.

[0271] *반-정량적 RT-PCR.* 총 RNA를 RNeasy 키트 (퀴아젠(Qiagen), 캘리포니아주 발렌시아)를 이용하여 추출하였다.

특이적 프라이머 및 형광성 프로브를 사용하여 증폭시키고, 유전자 발현을 정량화하였다 (31). 유전자-특이적 신호를 RPL19 하우스키핑 유전자에 대해 정규화하였다. 모든 택맨(TaqMan) qRT-PCR 시약을 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) (캘리포니아주 포스터 시티)로부터 구입하였다. 최소의 데이터 삼중 세트를 각각의 조건에 대해 분석하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 제시하였다.

[0272] *면역침전 및 이뮤노블롯팅.* 배양된 세포 또는 동결된 조직의 용해물을 완전 EDTA-무함유 프로테아제 억제제 칵테일 (로슈(Roche), 인디애나주 인디애나폴리스), 포스파타제 억제제 칵테일 1 및 2 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스), 2 mM 나트륨 플루오라이드 및 2 mM 오르토바나듐산나트륨이 보충된 RIPA 용해 완충제 (밀리포어(Millipore), 매사추세츠주 빌러리카)로 제조하였다. BCA 검정 (써모 피셔 사이언티픽)에 의해 결정된 바와 같은 동일한 양의 단백질을 FGFR4 (8G11; 제넨테크), FGFR3 (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 캘리포니아주 산타 크루즈), FGFR2 (진텍스(GeneTex), 캘리포니아주 어바인) 및 FGFR1 (산타 크루즈 바이오테크놀로지)에 대한 항체를 사용하는 이뮤노블롯 분석에 의해 분석하였다. 인간 간 용해물로부터, 이뮤노블롯 분석을 FGFR4의 면역침전에 이어서 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (16).

[0273] *FGFR4 모노클로날 항체의 생성.* FGFR4 널(null) 마우스를 재조합 인간 및 마우스 FGFR4-Fc 키메라 단백질 (제넨테크)로 면역화시켰다. 비장을 8주 후에 수확하고, 하이브리도마를 생성하였다. 배양된 상청액을 수집하고, 면역원에 대한 고체 상 항체 결합 검정에 의해 스크리닝하였다. 양성 세포주를 인간 및 마우스 FGFR4에 대한 FGF1 및 FGF19 결합을 억제하는데 있어서의 이들의 효능에 대해 고체 상 수용체 결합 검정을 이용하여 스크리닝하였다. LD1-생산 하이브리도마를 2회 서브클로닝하여 단일클론성을 보장하였다.

[0274] *LD1의 분자 클로닝.* 총 RNA를 RNeasy 미니 키트 (퀴아젠)를 이용하여 muLD1을 생산하는 하이브리도마 세포로부터 추출하였다. 가변 경쇄 및 가변 중쇄 도메인을 역전사-PCR (RT-PCR)을 이용하여 증폭시켰다. 정방향 프라이머는 가변 경쇄 및 가변 중쇄 영역의 NH_2-말단 아미노산 서열에 특이적이었다. 각각, 경쇄 및 중쇄 역방향 프라이머를 종들 사이에 고도로 보존된 불변 경쇄 및 불변 중쇄 도메인 1 내의 영역에 어닐링되도록 설계하였다. 증폭된 가변 경쇄를 인간 κ 불변 도메인을 함유하는 포유동물 발현 벡터에 클로닝하였다. 증폭된 가변 중쇄를 전장 인간 IgG1 불변 도메인을 코딩하는 포유동물 발현 벡터에 삽입하였다. 키메라 항체를 이전에 기재된 바와 같이 일시적으로 발현시켰다 (16). 실시예의 이 파트 A (도 1-9 포함)에 기재된 실험은 키메라 LD1을 사용하였다.

[0275] *고체 상 항체 결합 검정.* 맥시소르프(Maxisorp) 96 웰 플레이트를 밤새 4℃에서 50 μl의 2 μg/ml 항-인간 이뮤노글로불린 Fc 단편-특이적 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories), 펜실베니아주 웨스트 그로브) 또는 항-플래그 항체 (시그마-알드리치)로 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 200 μl PBS/3% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 1시간 동안 포화시키고, FGFR-IgG (제넨테크 및 R&D 시스템즈(R&D Systems), 미네소타주 미네아폴리스) 또는 플래그 태그 부착된-FGFR4 (FGFR4ΔTM-플래그)를 PBS/0.3% BSA 중에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 1시간 동안 항-FGFR4 항체와 PBS/0.3% BSA 중에서 인큐베이션하였다. 결합된 항체를 HRP-접합된 항-IgG (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈) 및 TMB 퍼옥시다제 발색 기질 (KPL, 메릴랜드주 게이더스버그)을 사용하여 검출하였다.

[0276] *유동 세포측정법 분석.* 유동 세포측정법 분석을 위한 세포를 5 mM EDTA를 함유하는 PBS로 재현탁시키고, 2% 열-불활성화 태아 소 혈청 (FBS)을 함유하는 PBS로 세척하였다. 모든 후속 단계는 얼음 상에서 수행하였다. 세포 ($1x10^6$개)를 1차 항체 (LD1 또는 이소형 대조군)와 30분 동안 인큐베이션한 후에, 피코에리트린 (PE)-접합된 항-인간 IgG 항체 (잭슨 이뮤노리서치)와 인큐베이션하였다. 세포를 팩스캔(FACScan) 유동 세포측정기 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 캘리포니아주 산 호세)로 분석하였다.

[0277] *DNA 구축물.* 인간 FGFR4 (hFGFR4) cDNA를 이전에 기재된 바와 같이 클로닝하였다 (16). FGFR4의 세포외 도메인을 또한 발현 벡터 pCMV-Tag4A (스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라 졸라)에 서브클로닝하여 C-말단에 플래그 태그를 갖는 FGFR4의 분비된 형태 (FGFR4ΔTM-플래그)를 수득하였다. 단일 뉴클레오티드 돌연변이를 퀵체인지(QuikChange) XL 부위-지정 돌연변이유발 키트 (스트라타진)를 이용하여 FGFR4ΔTM-플래그 구축물에 도입하였다. 본 발명자들은 또한 인간 FGFR1의 세포질 도메인 (FGFR1의 아미노산 잔기 K398 - R820)에 융합된 인간 FGFR4의 세포외 및 막횡단 도메인 (FGFR4의 아미노산 잔기 M1-G392)을 함유하는 인간 FGFR4-FGFR1 키메라 구축물 (hFGFR4/R1)을 생성하였다. FGFR4 (***볼드체***)를 FGFR1 (보통체)에 연결하는 아미노산 서열은 ・・・***AVLLLLAGLYRG***KMKSG・(서열 32)・・이다. hFGFR4 cDNA 또는 hFGFR4/R1 cDNA를 pQCXIP 레트로바이러스 비시스트론 발현 벡터 (클론테크 래보러토리즈(Clontech Laboratories), 캘리포니아주 마운틴 뷰)에 라이게이션하였다.

[0278] *FGFR4ΔTM-플래그-조건화 배지.* HEK293 세포를 야생형 또는 돌연변이체 FGFR4ΔTM-플래그 구축물 또는 상응하는 공벡터로 형질감염시키고, 혈청 무함유 PS25 배지 중에 72 내지 96시간 동안 유지하였다. 생성된 배지를 여과하고, HEPES pH 7.2 (최종 농도 40 mM) 및 프로테아제 억제제를 보충하고, 사용할 때까지 4℃에 저장하였다.

[0279] *세포 배양물 및 안정한 세포주.* HEK293, HEPG2 및 HEP3B 세포를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection) (ATCC, 버지니아주 마나사스)으로부터 수득하고, 10% FBS 및 2 mM L-글루타민이 보충된 F-12:DMEM 혼합물 (50:50) 중에 유지하였다. HUH7 및 PLC/PRF/5 세포를 DMEM 고글루코스, 10% FBS 중에서 배양하였다. JHH4, JHH5 및 JHH7 세포를 재패니즈 캔서 리서치 리소시즈 뱅크(Japanese Cancer Research Resources Bank) (일본 도쿄)로부터 구입하고, 10% FBS 및 2 mM L-글루타민이 보충된 윌리암스(Williams) 배지 E 중에 유지하였다. SNU449 세포를 ATCC로부터 수득하고, 10% FBS 및 2 mM L-글루타민을 함유하는 RPMI 1640 중에 유지하였다. BaF3 세포를 10% FBS, 1 ng/ml IL-3 및 2 mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 캘리포니아주 칼스배드) 중에 유지하였다. L6 세포를 ATCC로부터 수득하고, 10% FBS가 보충된 DMEM 고글루코스 중에 유지하였다.

[0280] BaF3 및 L6 세포의 배양물을 제조업체의 제안에 따라 공벡터, hFGFR4 또는 hFGFR4/R1 레트로바이러스 발현 벡터로 감염시키고, 2.5 μg/mL 퓨로마이신 (라이프 테크놀로지스)을 함유하는 배지 중에서 10 내지 12일 동안 선별하였다. 선별된 풀로부터, 최고 발현 세포의 제5 백분위수를 항-FGFR4 항체 (8G11; 제넨테크)를 사용하여 형광 활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 단리하였다. 높은 수준의 FGFR4를 발현하는 세포, 높은 수준의 FGFR4/R1을 발현하는 세포, 및 공벡터로 안정하게 형질감염된 대조 세포의 생성된 풀을 2.5 μg/mL 퓨로마이신을 함유하는 완전 배지 중에 유지하였다.

[0281] *유사분열촉진 검정.* BaF3/대조군, BaF3/FGFR4 및 BaF3/FGFR4/R1 세포를 2회 세척하고, 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 2 μg/ml 헤파린이 보충된 RPMI 1640 중에 96-웰 플레이트 (22,500개 세포/웰)에서 시딩하였다. FGF를 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 37℃에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 상대적 세포 밀도를 셀타이터-글로(프로메가, 위스콘신주 매디슨)를 제조업체의 제안에 따라 사용하여 측정하였다.

[0282] *FGF 경로 활성화의 항-FGFR4 항체 억제.* 세포를 LD1 또는 이소형 대조 항체의 부재 또는 존재하에 24시간 동안 혈청 고갈시켰다. 이어서, 이들을 5 ng/ml FGF1 (FGF 산성, R&D 시스템즈) 및 10 μg/ml 헤파린으로 5분 동안 자극하였다. 세포를 완전 EDTA-무함유 프로테아제 억제제 칵테일 (로슈), 포스파타제 억제제 칵테일 1 및 2 (시그마-알드리치), 2 mM 나트륨 플루오라이드 및 2 mM 오르토바나듐산나트륨이 보충된 RIPA 용해 완충제 (밀리포어)로 용해시켰다. 동일한 양의 단백질을 포스포-ERK1/2, 포스포-FRS2, ERK1/2 (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology), 매사추세츠주 댄버스) 및 FRS2 (밀리포어)에 대한 항체를 사용하여 이뮤노블롯에 의해 분석하였다.

[0283] *클론형성 검정.* HUH7 (5,000개 세포/웰), PLC/PRF/5 (2,000개 세포/웰), JHH5 (500개 세포/웰) 또는 JHH5/hFGFR4 shRNA (500개 세포/웰) 세포를 6 웰 플레이트에서 2 ml 배지/웰로 3중 시딩하였다. 시딩 3시간 후에, HUH7 및 PLC/PRF/5 세포를 항-FGFR4 항체 (chLD1; 제넨테크)의 부재 또는 존재하에 처리하였다. 항체를 실험 지속 기간 (14일) 동안 매주 2회 교체하였다. JHH5 및 JHH5/hFGFR4 shRNA 세포의 경우에, 2 mg/ml 독시시클린의 부재 또는 존재하의 처리를 시딩 3시간 후에 시작하고, 실험 지속 기간 동안 매주 3회 교체하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 0.5% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 콜로니를 메타모르프(MetaMorph) 소프트웨어 (Molecular Devices, 캘리포니아주 서니베일)를 이용하여 카운팅하였다.

[0284] *생체내 실험.* 모든 동물 프로토콜은 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받았다. 5 내지 6주령의 암컷 nu/nu 마우스를 찰스 리버 래보러토리즈 인터내셔널(Charles River Laboratories International) (매사추세츠주 윌밍톤)로부터 수득하였다. 마우스에게 주사 12시간 전까지 표준 먹이 및 음용수를 제공하고, 주사 12시간 전부터 먹이를 제거하였다. 마우스에게 대조군 또는 항-FGFR4 (chLD1) 항체를 복강내 (IP) 주사 (10 mg/kg)하였다. 18시간 후에, 마우스에게 비히클 (PBS) 또는 1 mg/kg FGF19를 정맥내 (IV) 투여하였다. 30분 후에, 모든 군으로부터의 마우스를 해부하고, 조직 샘플을 수집하고, 액체 질소에 동결시키고, -70℃에 저장하였다. 동결된 조직 샘플로부터의 총 RNA를 RNeasy 키트 (퀴아젠)를 이용하여 제조하였다. 3 내지 5마리 동물의 군을 각각의 조건에서 분석하였다. 데이터를 평균 ± SEM으로 제시하고, 스튜던트(Student) t-검정에 의해 분석하였다.

[0285] 이종이식편 실험에서, 6 내지 8주령의 nu/nu 암컷 마우스 (찰스 리버 래보러토리즈 인터내셔널)에게 5 x 10^6개 세포 (200 ul/마우스) 및 매트리겔(Matrigel) (BD 바이오사이언시스)을 피하 접종하였다. 7일 후에, 동등한 부피 (~150 mm^3)의 종양을 보유하는 마우스를 무작위적으로 분류하고 (n = 10), 매주 2회 IP 처리하였다. 종양을

전자 캘리퍼 (파울러 실백 울트라-칼 마크 III(Fowler Sylvac Ultra-Cal Mark III); 프레드 브이. 파울러 캄파니(Fred V. Fowler Company), 매사추세츠주 뉴턴)로 측정하고, 평균 종양 부피를 식: (W^2 x L)/2 (여기서, W 및 L은 각각 보다 작은 직경 및 보다 큰 직경임)을 이용하여 계산하였다. 데이터를 평균 종양 부피 ± SEM으로 제시하고, 스튜던트 t-검정에 의해 분석하였다.

[0286] FGF19 트랜스제닉 마우스를 이전에 기재된 바와 같이 생성하였다 (32). FGFR4 널 돌연변이체 (FGFR4-KO) 동물이 이전에 보고된 바와 같이 구축되었고 (33), 물질 이전 계약(Material Transfer Agreement) (텍사스 대학 사우스웨스턴 메디컬 센터(University of Texas Southwestern Medical Center), 텍사스주 달라스) 하에 더블유. 엘. 매키언(W. L. McKeehan)이 제공하였다. FGF19를 과다발현하며 FGFR4 수용체가 결핍된 (FGF19-TG:FGFR4-KO) 마우스를 어린 성체 FGF19-TG 수컷을 어린 성체 FGFR4-KO 암컷과 교배하여 만들었다. 양쪽 유전자 조작 사건의 존재를 이유시에 꼬리 DNA 상에서의 PCR에 의해 확인하였다.

[0287] **결과**

[0288] *FGFR4는 FGF19 트랜스제닉 마우스에서 간암발생에 필요하다.* 트랜스제닉 마우스에서 FGF19의 외인성 발현은 이전에 생후 10개월까지 HCC를 유발하는 것으로 밝혀졌다 (18). FGFR4가 이 FGF19-매개된 종양발생과 관련이 있는지를 평가하기 위해, 본 발명자들은 FGF19 트랜스제닉 (FGF19-TG) 마우스를 FGFR4 녹아웃 (FGFR4-KO) 마우스 또는 FGFR4 야생형 (FGFR4-WT) 마우스와 교배시켰다. 마우스를 다양한 시점에서 해부하고, 간암발생을 총체적 및 조직학적 조사를 수행하고, 전신생물성 간세포 증식 (즉, BrdU 혼입)을 측정함으로써 평가하였다. FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스에서의 HCC의 발생은 이전에 기재된 바와 같다 (18). FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스와는 대조적으로, FGF19-TG:FGFR4-KO 마우스는 이 실험 동안 어떠한 시점에서도 간세포 신생물의 총체적 또는 조직학적 증거를 나타내지 않았다 (도 1a). 또한, 전신생물성 간세포 증식은 FGFR4-WT 유전자형을 갖는 FGF19-TG 마우스에서 유의하게 상승하였으나, FGF19-TG:FGFR4-KO 한배새끼에서는 증명되지 않았다 (도 1b). 암컷 FGF19-TG 마우스에서 이전에 보고된 종양 발생의 보다 높은 빈도 및 중증도와 일치하게 (18), BrdU 혼입이 FGF19-TG:FGFR4-WT 암컷에서 상응하는 수컷에 비해 증가하였다 (도 1b의 좌측 및 우측 패널 비교). 본 발명자들은 또한 FGF19-TG 마우스에서의 HCC의 발생에 대한 디에틸니트로사민 (DEN) (강력한 간 발암물질)의 영향을 평가하였다. DEN의 투여는 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스에서 HCC의 발생을 가속화시켰다. 전신생물성 및 신생물성 병변의 전체 범위 - 변경된 (염기친화성) 간 중심, 주심 간세포 이형성, 잘 분화된 간세포 신생물 및 공격성 간세포성 암종 - 가 모든 DEN-처리된 FGF19-TG:FGFR4-WT 동물로부터의 간에서 비-DEN 처리된 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스의 경우의 생후 10개월에 비해 생후 4개월까지 관찰되었다 (도 1d). 모든 시점에서의 거의 모든 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스로부터의 간의 기본적인 형태적 특성은 다수의 엽 상의 매우 명백한 HCC의 결절이었다 (도 1c). 종양 부담은 간 중량을 측정함으로써 평가하였다. 상대적 간 중량은 DEN으로 처리된 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스에서 모든 시점에서 점진적으로 증가하였다 (도 1e). 흥미롭게도, 간 중량의 증가는 수컷 (6개월에서 1.8배)에서보다 암컷 (6개월에서 2.7배)에서 보다 두드러졌다 (도 1e의 좌측 및 우측 패널 비교). 생후 6개월이 넘도록 생존한 수컷은 전혀 없다는 것에 주목하여야 한다 (도 1e). DEN으로 처리된 FGF19-TG:FGFR4-WT 마우스에서 관찰된 간암발생은 FGFR4-KO 마우스에서의 FGFR4 발현의 제거에 의해 없어졌다. 따라서, FGF19-TG:FGFR4-KO 마우스의 상대적 간 중량은 성체기 동안 일정하게 유지되었다 (도 1f). 이들 결과는 FGFR4 발현이 마우스에서 FGF19-촉진된 간암발생에 필요하다는 것을 제안한다.

[0289] *항-FGFR4 중화 모노클로날 항체의 생성.* FGFR4의 표적화가 HCC에서 치료 효과를 나타낼 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 FGFR4-KO 마우스를 재조합 마우스 및 인간 FGFR4로 면역화시켜 FGFR4-특이적 모노클로날 항체를 생성하였다. 생성된 클론 중 하나 (LD1로 명명됨)를 마우스, 시노몰구스 원숭이 및 인간 FGFR4에 대한 그의 결합 특이성에 대해 선별하였다 (도 2a). 이 항체는 마우스 또는 인간 FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3에 결합하지 않았다 (도 2a). 표면 플라즈몬 공명 분석은 LD1이 마우스, 시노몰구스 원숭이 및 인간 FGFR4에 대등한 친화도로 결합한다는 것을 보여주었다 (도 2b). 본 발명자들은 유동 세포측정법을 이용하여 LD1이 세포 표면에 존재하는 FGFR4에 결합하는지 여부를 평가하였다. 인간 FGFR4로 안정하게 형질감염된 HEK293 세포에 대한 LD1의 특이적 결합은 첨가된 항체의 농도에 비례하였다 (도 2c). 공벡터로 안정하게 형질감염된 대조 HEK293 세포에 대한 LD1의 결합은 없었다. 이들 데이터는 함께 LD1이 마우스, 시노몰구스 원숭이 및 인간 FGFR4에 특이적으로 결합하며, 또한 세포 표면에서 발현되었을 때 인간 수용체를 인식한다는 것을 입증한다.

[0290] LD1에 대해 FGFR4 에피토프를 맵핑하기 위해, 본 발명자들은 마우스 및 인간 FGFR1, FGFR2, FGFR3 및 FGFR4의 아미노산 서열을 비교하였다. 8개의 아미노산을 FGFR4 오르토로그 사이에서의 이들의 유사점 및 FGFR1-3 오르토로그에서의 이들의 차이점에 기초하여 선별하였다. FGFR4에서의 이들 아미노산을 FGFR3에서의 동등한 위치에

존재하는 아미노산으로 치환하여 인간 FGFR4의 8개의 상이한 돌연변이체 구축물을 생성하였다. 이들 구축물을 발현시키고, 고체 상 결합 검정을 이용하여 LD1 결합에 대해 평가하였다. LD1은 야생형 FGFR4 및 대부분의 돌연변이체 구축물에 동등하게 잘 결합하였고; G165A는 오직 LD1 결합이 손상된 FGFR4 돌연변이체에 결합하였다 (도 2d). LD1은 음성 대조군 야생형 FGFR3에 결합하지 않았다 (도 2d). 본 발명자들은 또한 이뮤노블롯 분석을 이용하여 돌연변이체 구축물에 대한 LD1의 결합을 시험하였다. 모든 이전에 기재된 단백질 구축물을 환원시키고, 변성시키고, 전기영동시키고, 니트로셀룰로스에 전기-이동시켰다. 니트로셀룰로스 막을 LD1, 상이한 에피토프를 인식하는 항-FGFR4 항체 (8G11) 또는 항-플래그 항체와 순차적으로 인큐베이션하였다. 항-플래그 항체 및 8G11은 야생형 FGFR4 및 모든 FGFR4 돌연변이체 구축물을 검출한 한편, LD1은 G165A 돌연변이체를 제외하고는 모든 구축물을 동등하게 잘 검출하였다 (도 2e). 대조 레인에서는 단백질 밴드가 어떠한 항체에 의해서도 검출되지 않았다 (도 2e). 본 발명자들은 FGF19의 2개의 분자에 결합된 FGFR4 이량체의 3차원 모델을 생성하여 G165의 위치를 시각화하였다 (도 2f). G165는 2개의 FGFR4 유닛 사이의 접촉 지점에서 FGFR4-FGF19 복합체의 중심에 국재화된다. 이들 결과는 함께 G165가 LD1의 인간 FGFR4와의 상호작용에 중요하다는 것을 보여준다. 환원 및 변성된 FGFR4에 대한 LD1의 결합은 또한 에피토프가 삼원성 확인에 따라 달라지지 않는다는 것을 제안한다.

[0291] 다음에 본 발명자들은 LD1이 FGFR4에 대한 FGF1 및 FGF19의 결합을 차단할 수 있는지의 여부를 고체 상 수용체-결합 검정을 이용하여 시험하였다. FGF 결합의 LD1 억제는 용량-의존성이었으며, FGF1의 경우에 0.093 ± 0.006 nM 및 FGF19의 경우에 0.102 ± 0.003 nM의 IC_{50}에 도달하였다 (도 3a). LD1이 세포 표면에서 발현된 FGFR4의 기능을 억제할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 우선 FGFR4의 세포외 도메인 및 FGFR1의 세포내 도메인을 코딩하는 키메라 구축물로 안정하게 형질감염된 BaF3 뮤린 프로-B 세포주 (BaF3/FGFR4/R1)를 사용하였다. 야생형 BaF3 세포주는 어떠한 FGFR도 발현하지 않는 인터류킨-3 (IL-3)-의존성 세포주이다. FGFR로 형질감염된 BaF3 세포는 FGF 및 헤파린으로 자극한 경우에 IL-3의 부재 하에 증식한다 (21). 이 구축물의 형질감염은 본 발명자들이 IL-3을 FGF로 치환하는 것을 허용하여 BaF3 세포의 성장을 돕는다. 5 nM FGF1의 존재하에, LD1은 BaF3/FGFR4/R1 세포의 증식을 17.4 ± 5.4 nM의 IC_{50}으로 억제하였다 (도 3b).

[0292] 본 발명자들은 또한 FGFR4를 발현하는 벡터로 안정하게 형질감염된 L6 래트 골격근 세포주 (L6/FGFR4)를 사용하여 FGF 신호전달에 대한 LD1의 영향을 평가하였다. L6/FGFR4 세포 배양물에 대한 FGF1 및 헤파린의 첨가는 FGFR 기질 2 (FRS2) 및 세포외 신호-조절된 키나제 1/2 (ERK1/2)의 인산화에 의해 입증된 바와 같이 FGFR 경로를 활성화시킨 반면 LD1은 이들 2차 메신저의 리간드-유도된 인산화를 용량-의존성 방식으로 억제하였다 (도 3c). 흥미롭게도, LD1의 첨가는 또한 이들 세포에서 총 FRS2 함량을 증가시켰다 (도 3c).

[0293] 유동 세포측정법을 이용하여 본 발명자들은 LD1의 결합을 평가하고, HCC 세포주의 하위세트의 세포 표면에서의 FGFR4의 발현을 확인하였다. LD1은 PLC/PRF/5에 가장 고도로 결합하고, HUH7 및 JHH5 세포에는 보다 적은 정도로 결합하였다 (도 3d). 이들 세포의 표면에 대한 대조 항체의 결합은 무시할만하였다 (도 3d). 또한, BaF3 세포 (이들이 FGFR4를 발현하지 않기 때문에 음성 대조군으로 사용됨)의 표면에 대한 LD1 및 대조 항체의 결합이 또한 무시할만하였다 (도 3d).

[0294] *LD1은 간암 세포주에서 FGFR4 기능을 억제한다.* LD1의 억제 활성은 다양한 수준의 내인성 FGFR (즉, FGFR1-4) 발현을 갖는 간암 세포주를 사용하여 특성화하였다 (도 7). HEP3B 세포에서, FGF19의 첨가는 FRS2 및 ERK1/2의 인산화를 일으키는 한편 LD1은 FRS2의 FGF19-자극된 인산화를 억제하였으며 (도 4a), 이는 L6/FGFR4 세포에 대한 영향과 유사하였다. 그러나, LD1은 ERK1/2의 인산화를 눈에 띄게 변경시키지 않았다 (도 4a).

[0295] 시토크롬 P450 7α1 (CYP7α1) 및 c-Fos의 발현은 간 세포주에서 FGF19에 의해 조정된다 (16, 22). 본 발명자들은 LD1이 이 FGF19-매개된 유전자 조정을 억제할 수 있는지의 여부를 시험하였다. HEB3B 세포에서, FGF19의 첨가는 CYP7α1의 발현을 81% 감소시켰다 (도 4b). LD1의 첨가는 CYP7α1의 기초 발현의 67%를 복구하였다 (도 4b). 첨가된 FGF19의 부재하에, LD1은 CYP7α1 발현을 2배 증가시켰다 (도 4b). FGF19의 첨가는 HUH7 세포에서 CYP7α1의 발현에 영향을 미치지 않았지만, LD1의 첨가는 이 유전자의 발현을 FGF19의 존재 또는 부재하에 각각 2.9배 및 3.5배 증가시키면서 HEP3B 세포에서와 유사한 효과를 나타내었다 (도 8). 음성 대조 항체의 첨가는 HEP3B 또는 HUH7 세포에서 CYP7α1의 발현에 대해 영향을 미치지 않았다 (각각 도 4b 및 8). 흥미롭게도, LD1의 첨가는 HEP3B 및 HUH7 세포 둘 다에서 외인성으로 첨가된 FGFR4 리간드의 부재하에 CYP7α1 발현의 상향 조절을 유도한다. 이는 LD1이 아마도 FGFR4 리간드 자가분비/주변분비 루프에 의해 유지될 FGFR4 기초 활성을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0296] FGFR4의 기초 활성에 대한 LD1의 영향을 추가로 평가하기 위해, 본 발명자들은 외인성으로 첨가된 FGFR4 리간드

의 부재하에 c-Fos의 발현을 측정하였다. FGFR4 경로의 활성화는 이전에 c-Fos의 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 (16). LD1의 첨가는 c-Fos의 기초 발현을 JHH5, JHH7 및 HUH7 세포주에서 50% 및 PLC/PRF/5 세포주에서 75% 감소시켰으며; 대조 항체의 첨가는 기초 c-Fos 발현에 영향을 미치지 않았다 (도 4c). 이들 결과는 FGFR4의 기초 활성을 억제하는 LD1의 능력을 입증한다.

[0297] *LD1은 콜로니 형성을 억제한다.* 본 발명자들은 우선 독시시클린-유도성 FGFR4 특이적 shRNA 또는 대조 shRNA로 안정하게 형질감염된 JHH5 세포에 의한 콜로니 형성을 측정하였다. 대조 구축물로 형질감염된 JHH5 세포가 독시시클린의 부재 또는 존재하에 콜로니를 형성하는 능력에는 차이가 없었으나, FGFR4 shRNA 구축물로 형질감염된 JHH5 세포로의 독시시클린의 첨가는 콜로니 형성을 독시시클린의 부재하의 세포에 비해 76% 억제하였다 (도 4d). 이 결과는 FGFR4가 간암 세포주의 콜로니 형성에 관련된다고 제안한다.

[0298] 다음에 본 발명자들은 LD1이 간암 세포주의 패널에 의한 콜로니 형성을 억제하는 능력을 시험하였다. JHH5, HUH7 및 PLC/PRF/5 세포의 배양물로의 LD1의 첨가는 콜로니 형성을 용량-의존성으로 감소시켰으며, 각각 26%, 50% 및 82%의 최대 억제에 도달하였다 (도 4f). PLC/PRF/5 및 HUH7 세포 배양물의 대표적인 예는 도 4e에 도시하였다. 대조 항체의 첨가는 콜로니 형성을 영향을 미치지 않았다 (도 4e 및 4f). 이들 결과는 LD1이 간암 세포주에서 FGFR4-매개된 콜로니 형성을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0299] *LD1은 FGFR4 생체내 활성을 억제한다.* 본 발명자들은 LD1 또는 대조 항체를 주사한 마우스의 간에서 FGF19-유발된 c-Fos 유도를 측정함으로써 LD1의 생체내 효능을 평가하였다. 본 발명자들은 간에서의 c-Fos 유도가 FGF19 자극에 민감하기 때문에 FGF19에 대한 c-Fos 반응을 모니터링하기로 하였다 (16). C-Fos 발현은 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 처리된 마우스의 간에 비해 FGF19로 처리된 마우스의 간에서 53배 더 높았다 (도 5a). FGF19의 주사 18시간 전의 LD1 18의 투여는 c-Fos 유도를 3.5배 감소시켰다 (도 5a). LD1은 또한 나이브 마우스에서 c-Fos 발현의 기초 수준을 6배 감소시켰다 (도 5a). 대조 항체의 주사는 c-Fos의 기초 또는 FGF19-자극된 발현을 비-처리된 마우스에 비해 변경시키지 않았다 (도 5a). 이들 데이터는 기초 및 FGF19-자극된 FGFR4 활성을 억제하는데 있어서의 LD1의 생체내 효능을 입증하였다.

[0300] *LD1은 생체내에서 종양 성장을 억제한다.* 종양 성장을 억제하는데 있어서의 LD1의 생체내 효능을 조사하기 위해, 본 발명자들은 우선 HUH7 간암 세포주 이종이식편 모델을 이용하였다. 확립된 종양 (대략 150 mm^3)을 보유하는 마우스에게 30 mg/kg LD1, 30 mg/kg 대조 항체 또는 PBS를 매주 투여하였다. 13일 후에, PBS 또는 대조 항체로 처리된 마우스의 HUH7 종양은 720 mm^3의 평균 크기로 성장하였다 (도 5b). 그러나, LD1로 처리된 마우스의 HUH7 종양은 28 mm^3의 평균 크기로 성장하였으며, 이는 대조 항체 또는 PBS에 비해 종양 성장이 96% 억제된 것이었다 (도 5b). 반복 실험에서, 30 mg/kg의 LD1의 매주 2회 투여는 종양 성장을 완전히 억제하였다 (도 9). 해부시에, 종양을 절제하고, FGFR4 및 FGFR4-조절된 유전자의 발현에 대한 LD1의 영향을 평가하였다. LD1의 투여는 HUH7 이종이식편 종양에서 FGFR4 발현에 영향을 미치지 않았다 (도 5c). 그러나, LD1은 CYP7α1의 발현을 PBS 처리된 마우스의 종양에서 측정된 CYP7α1의 발현 수준에 비해 3배 증가시켰다 (도 5c). LD1은 또한 c-Fos 및 egr-1의 발현을 PBS-처리된 마우스에 비해 각각 17배 및 6배 감소시켰다 (도 5c).

[0301] LD1의 생체내 효능을 추가로 평가하기 위해, 본 발명자들은 FGF19-TG 마우스 모델을 이용하였다. FGF19-TG 마우스를 생후 15일에 DEN으로 처리하여 종양발생을 가속화시킨 후에 생후 4주에 무작위적으로 3개의 코호트로 분류하였다. 한 군에는 대조 항체를, 다른 2개의 군에는 LD1 또는 항-FGF19 항체 (1A6)를 매주 기준으로 투여하였다. 1A6은 이전에 FGF19-TG 마우스에서 종양 형성을 방지하는 것으로 밝혀졌다 (23). 6개월 후에, 마우스를 해부하고, 분석을 위해 간을 절제하였다. 대조 항체로 처리된 마우스의 간에는 다수의 엽 상에 매우 명백하게 큰 결절이 있었다 (도 5d). 그러나, LD1 (도 5d) 또는 1A6로 처리된 마우스의 간에서는 신생물의 증거가 없었다. 본 발명자들은 또한 간 중량을 측정하여 종양 부담을 평가하였는데, 이는 이 파라미터가 이전에 FGF19-TG 모델에서 종양 부피 퍼센트와 밀접하게 관련이 있는 것으로 밝혀졌기 때문이다 (18, 23). LD1 또는 1A6으로 처리된 마우스로부터의 간 중량은 대조 항체로 처리된 마우스로부터의 간 중량보다 유의하게 (각각, $p = 0.035$ 및 $p = 0.052$) 더 낮았다 (도 5e). LD1로 처리된 마우스와 1A6으로 처리된 마우스 사이의 간 중량의 차이는 유의하지 않았다 ($p = 0.439$) (도 5e). 이들 데이터는 함께 전임상 모델에서 간세포성 암종을 억제하는데 있어서의 LD1의 생체내 효능을 명백하게 입증한다.

[0302] *FGFR4 발현은 암에서 변경된다.* 본 발명자들은 다양한 인간 정상 및 암성 조직에서의 FGFR4 발현을 바이오익스프레스 데이터베이스 (진 로직, 인크., 미국 메릴랜드주 게이더스버그)를 분석함으로써 평가하였다. FGFR4 발현은 대부분의 유형의 암에서 매우 가변적이었다. 정상 조직에 비해, FGFR4 발현은 간, 결장직장, 위, 식도 및

고환 암에서 상승하였으나, 신장, 폐, 림프 및 소장 암에서는 감소하였다 (도 6a). 면역조직화학 (IHC)을 이용하여 본 발명자들은 폐, 유방, 췌장 및 난소 선암종, 폐 편평 세포 암종, 간세포성 암종, 갑상선 암종, 및 정상 폐, 췌장, 및 갑상선 샘플의 패널에서 FGFR4를 국재화시켰다. FGFR4의 검출에서 정상 및 신생물성 상피 세포의 막 및 세포질을 염색하였다 (대표적인 예는 도 6b에 도시되어 있음). 정상 조직에 비해, 보다 높은 등급의 염색이 일반적으로 종양 샘플에서 발견되었다. 항-FGFR4에 의한 중간 정도 내지 현저한 표지가 췌장 (시편의 41%), 유방 (46%), 폐 (31%), 난소 (41%), 결장 (90%), 간 (33%) 및 갑상선 (11%)으로부터의 종양에서 분명하게 나타났다 (표 2 및 참고문헌 23).

[0303] <표 2>

[0304] 정상 및 암 조직에서의 FGFR4 발현. FGFR4 면역염색의 조직병리학적 평가에 의해 결정된 바와 같은 정상 및 암 조직에서의 FGFR4 발현의 유병률.

		등급			
	샘플의 수	0	1+	2+	3+
폐 선암종	29	7 (24%)	13 (45%)	7 (24%)	2 (7%)
폐 편평 세포 암종	23	7 (30%)	15 (65%)	1 (4%)	0
유방 선암종	63	1 (2%)	33 (52%)	25 (40%)	4 (6%)
갑상선 암종	86	16 (19%)	60 (70%)	9 (10%)	1 (1%)
췌장 선암종	67	4 (6%)	36 (54%)	24 (36%)	3 (5%)
난소 선암종	80	9 (11%)	38 (48%)	26 (32%)	7 (9%)
정상 폐	4	3 (75%)	1 (25%)	0	0
정상 갑상선	9	2 (22%)	7 (78%)	0	0
정상 췌장	23	2 (9%)	17 (74%)	3 (13%)	1 (4%)

[0305]

[0306] 인간 HCC에서의 FGFR4의 광범위한 발현은 또한 이전에 계내 혼성화에 의해 확인되었다 (23). FGFR4 및 HCC 사이의 연결이 이미 제안되었기 때문에 본 발명자들은 23개의 원발성 인간 간 종양 및 11개의 정상 간에서의 FGFR4 발현을 정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 이용하여 추가로 평가하기로 결정하였다. 각각의 샘플에서의 FGFR4의 발현을 첫번째 정상 간 샘플 (N1)에서 이 수용체의 발현에 대해 정규화시켰다. FGFR4의 평균 수준이 간 종양 (1.22 ± 0.05배)에서 정상 간 (0.90 ± 0.04배)에 비해 중간 정도로 증가하였으나, 그 차이는 그 집단을 전체로 간주하였을 때 통계적 유의성에 도달하지 못하였다 ($p = 0.23$) (도 6c). 그러나, FGFR4 발현은 종양의 하위세트 (7/23; 30%)에서 유의하게 더 높았다 (2배 초과). 이들 결과는 FGFR4 발현이 여러 유형의 암에서 탈조절된다는 것을 설명한다. 간 종양의 하위세트에서의 FGFR4의 증가된 발현은 이것이 진단적-선별된 환자 집단에서 간암의 치료를 위한 매력적인 표적을 나타낼 수 있다고 제안한다.

[0307] 이 연구에서, 본 발명자들은 FGFR4가 간세포성 암종에 참여하고, FGFR4 불활성화 항체로의 처리가 항-종양 이익을 제공할 수 있다는 증거를 제공한다. 간 종양발생에 있어 FGFR4의 참여를 평가하기 위해 본 발명자들은 유전자 조작된 마우스 모델을 이용하였다. FGF19의 외인성 발현은 마우스에서 간세포 증식, 간세포 이형성, 및 HCC의 발생을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 본 발명자들 및 다른 사람들이 클로토(Klotho) β가 FGF19의 간-특이적 활성에 요구된다는 것을 입증하였다 (16, 19, 24). KLB 및 FGFR4는 간에서 최고도로 발현되기 때문에, 본 발명자들은 FGFR4 경로의 탈조절이 FGF19-매개된 간 종양발생을 일으킬 것으로 가정하였다. 이 가설을 시험하기 위해 본 발명자들은 FGF19-TG 마우스를 FGFR4-KO 마우스와 교배시켰다. 전신생물성 간세포 증식 및 간세포 신생물은 오직 FGFR4-WT 백그라운드를 갖는 FGF19-TG 마우스에서만 발견되었다. 간 종양발생은 FGFR4-KO 마우스에서 없어졌다. 본 발명자들은 마우스에게 강력한 간 발암물질인 디에틸니트로사민을 투여함으로써 추가 접종하였다. DEN으로의 처리는 FGFR4-WT 백그라운드를 갖는 FGF19-TG 마우스에서의 HCC의 발생을 가속화시킨 반면, FGFR4-KO 마우스에서는 간 신생물의 증거가 발견되지 않았다. 명백한 결론은 FGFR4가 FGF19-촉진된 간 종양발생에 요구된다는 것이다.

[0308] 이들 데이터는 함께 FGFR4, 간 종양발생, 및 간암 진행 사이의 연결을 제안한다. 결론적으로, FGFR4는 잠재적 치료 표적이고, 그의 억제는 간암 환자에게 치료 이익을 제공할 수 있다. 이를 위해 본 발명자들은 항-FGFR4 중화 항체 (LD1)를 개발하였다. LD1은 FGFR4에 결합하여, 리간드 결합, 경로 활성화, 유전자 발현의 조절, 세

포 증식, 및 시험관내 콜로니 형성을 억제한다. LD1이 FGFR4에 결합하는 부위를 FGFR4 오르토로그 사이에서는 유사하지만 FGFR1-3 오르토로그에서는 다른 부위에서 점 돌연변이를 보유하는 FGFR4 구축물과 LD1의 상호작용을 평가함으로써 국재화시켰으며, FGFR4 내의 이들 아미노산 잔기는 FGFR3에서 동등한 위치에 존재하는 아미노산 잔기로 치환시켰다. LD1은 G165A 돌연변이체를 제외하고 야생형 FGFR4 및 모든 돌연변이체 FGFR4 구축물에 결합하였다. FGFR4의 위치 165에서 글리신을 아닐린으로 교체하면 LD1 결합이 거의 제거되었다. FGFR4에 대한 LD1의 정교한 특이성은 FGFR 사이에서의 이 영역의 높은 동일성과 함께 LD1 결합에 이 잔기가 중요함을 강조한다. FGFR4 내의 글리신 165는 FGFR1 내의 알라닌 171에 상응한다. 흥미롭게도, 알라닌 171은 FGFR1 이량체 인터페이스에서 가장 가까이 접근한 잔기이다 (25). 이량체의 축을 가로질러, 한 수용체의 알라닌 171의 측쇄는 인접한 수용체의 알라닌 171과 소수성 접촉을 형성한다. FGFR의 이 영역에서의 서열 보존은 수용체-수용체 인터페이스를 형성하는 이 영역과 일치한다 (25). 따라서, FGFR의 이 동등한 영역에 대한 LD1의 결합은 아마도 수용체 이량체화를 파괴할 것이다. 리간드-유도된 수용체 이량체화는 FGFR의 활성화에 필수적이다 (26, 27). 따라서, FGFR4 이량체화의 억제는 LD1에 대한 잠재적 작용 메카니즘이다. 유사한 작용 메커니즘이 이미 다른 치료 항체에 대해 기재되어 있다 (28).

[0309] 본 발명자들은 생체내에서 LD1이 FGFR4로부터의 하류의 유전자 조절을 억제하고, 종양 성장 차단함으로써 간암 이종이식편 종양에 작용한다는 것을 보여주었다. 또한, LD1의 투여는 FGF19-TG 마우스에서 HCC의 형성 및 발생을 억제하였다.

[0310] 이들 데이터는 FGFR4가 종양발생 및 암 진행의 촉진에 관여한다는 것을 입증한다. 특히, 본 발명자들의 결과는 FGFR4가 간세포성 암종에서 중요한 역할을 수행할 수 있다고 제안한다. 여러 증거가 이 가설을 뒷받침한다. FGFR4는 인간 간세포에 존재하는 우세한 FGFR 이소형이다 (15). 본 발명자들은 이전에 간 조직이 최고의 FGFR4 및 KLB 전사체 수준을 갖는다고 보고하였으며, 이들은 둘 다 이 신호전달 복합체에 의한 리간드-자극된 활성에 필수적이다 (16). 또한, 마우스에서 FGF19 (즉, FGFR4-특이적 리간드)의 이소성 발현은 간세포 증식, 간세포 이형성, 및 신생물을 촉진하고 (18), FGF19-유도된 간세포 증식은 유일하게 FGFR4에 의해 매개되는 것으로 보고되었다 (24). 최근의 보고는 FGFR4가 또한 알파-태아단백질 분비, 증식, 및 항-아폽토시스를 조절함으로써 HCC 진행에 유의하게 기여한다고 제안한다 (17). FGFR4 발현은 또한 화학요법에 대한 내성을 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (29). 한 군은 마우스에서 FGFR4에 대해 HCC 촉진 효과 보다는 오히려 보호 역할을 하는 것을 보고되었음에 주목해야 한다 (30). 리간드의 일체성 및 농도 뿐만 아니라 FGFR 및 보조-수용체 발현의 수준을 포함하는 맥락적 요인이 종양발생에서 FGFR4의 역할을 조절할 수도 있다는 것이 가능하다. 예를 들어, 본 발명자들은 FGFR4 발현이 원발성 간 종양의 하위세트에서 유의하게 증가된다는 것을 발견하였으며, 이는 FGFR4가 진단적-선별된 환자 집단에서 간암의 치료를 위한 매력적인 표적을 나타낼 수 있다고 제안한다. 간 종양발생 및 HCC 진행에서 FGFR4의 참여에 대한 증거를 모아, 본 발명자들은 항-FGFR4 중화 항체를 포함하는 치료적 개입이 간암의 치료에 유익할 수 있을 것으로 생각하였다.

[0311] 부분 참고문헌 목록

1. Ornitz, D.M., and Itoh, N. 2001. Fibroblast growth factors. Genome Biol 2:REVIEWS3005.

2. Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev 16:139-149.

[0312]

3. Powers, C.J., McLeskey, S.W., and Wellstein, A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocr Relat Cancer 7:165-197.

4. Bange, J., Prechtl, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., et al. 2002. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. Cancer Res 62:840-847.

5. Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P., and Radvanyi, F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. Nat Genet 23:18-20.

6. Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 2001. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. Blood 97:729-736.

7. Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. Nat Genet 16:260-264.

8. Gowardhan, B., Douglas, D.A., Mathers, M.E., McKie, A.B., McCracken, S.R., Robson, C.N., and Leung, H.Y. 2005. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. Br J Cancer 92:320-327.

9. Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P., and Nevanlinna, H. 1993. Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. Int J Cancer 54:378-382.

10. Jang, J.H., Shin, K.H., and Park, J.G. 2001. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. Cancer Res 61:3541-3543.

11. Jang, J.H., Shin, K.H., Park, Y.J., Lee, R.J., McKeehan, W.L., and Park, J.G. 2000. Novel transcripts of fibroblast growth factor receptor 3 reveal aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in colorectal cancer. Cancer Res 60:4049-4052.

12. Jeffers, M., LaRochelle, W.J., and Lichenstein, H.S. 2002. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. Expert Opin Ther Targets 6:469-482.

[0313]

13. Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J., and Fletcher, J.A. 1998. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. Nat Genet 18:84-87.

14. Shariff, M.I., Cox, I.J., Gomaa, A.I., Khan, S.A., Gedroyc, W., and Taylor-Robinson, S.D. 2009. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 3:353-367.

15. Kan, M., Wu, X., Wang, F., and McKeehan, W.L. 1999. Specificity for fibroblast growth factors determined by heparan sulfate in a binary complex with the receptor kinase. J Biol Chem 274:15947-15952.

16. Lin, B.C., Wang, M., Blackmore, C., and Desnoyers, L.R. 2007. Liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta. J Biol Chem 282:27277-27284.

17. Ho, H.K., Pok, S., Streit, S., Ruhe, J.E., Hart, S., Lim, K.S., Loo, H.L., Aung, M.O., Lim, S.G., and Ullrich, A. 2009. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. J Hepatol 50:118-127.

18. Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E., Hillan, K., Wright, B., Frantz, G.D., Pham, T.A., Dillard-Telm, L., Tsai, S.P., Stephan, J.P., et al. 2002. A mouse model of hepatocellular carcinoma : ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. Am J Pathol 160:2295-2307.

19. Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A.V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Kliewer, S.A., and Kuro-o, M. 2007. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. J Biol Chem 282:26687-26695.

20. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K., and French, D.M. 2008. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. Cancer Res 68:5086-5095.

21. Ornitz, D.M., Yayon, A., Flanagan, J.G., Svahn, C.M., Levi, E., and Leder, P. 1992. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. Mol Cell Biol 12:240-247.

[0314]

22. Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang da, Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., et al. 2003. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. Genes Dev 17:1581-1591.

23. Desnoyers, L.R., Pai, R., Ferrando, R.E., Hotzel, K., Le, T., Ross, J., Carano, R., D'Souza, A., Qing, J., Mohtashemi, I., et al. 2008. Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. Oncogene 27:85-97.

24. Wu, X., Ge, H., Gupte, J., Weiszmann, J., Shimamoto, G., Stevens, J., Hawkins, N., Lemon, B., Shen, W., Xu, J., et al. 2007. Co-receptor requirements for fibroblast growth factor-19 signaling. J Biol Chem 282:29069-29072.

25. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., and Mohammadi, M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. Cell 98:641-650.

26. Ibrahimi, O.A., Yeh, B.K., Eliseenkova, A.V., Zhang, F., Olsen, S.K., Igarashi, M., Aaronson, S.A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M. 2005. Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization. Mol Cell Biol 25:671-684.

27. Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahimi, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. Cytokine Growth Factor Rev 16:107-137.

28. Agus, D.B., Akita, R.W., Fox, W.D., Lewis, G.D., Higgins, B., Pisacane, P.I., Lofgren, J.A., Tindell, C., Evans, D.P., Maiese, K., et al. 2002. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. Cancer Cell 2:127-137.

29. Roidl, A., Berger, H.J., Kumar, S., Bange, J., Knyazev, P., and Ullrich, A. 2009. Resistance to chemotherapy is associated with fibroblast growth factor receptor 4 up-regulation. Clin Cancer Res 15:2058-2066.

30. Huang, X., Yang, C., Jin, C., Luo, Y., Wang, F., and McKeehan, W.L. 2009. Resident hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 limits hepatocarcinogenesis. Mol Carcinog 48:553-562.

31. Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., and Williams, P.M. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. Anal Biochem 270:41-49.

32. Tomlinson, E., Fu, L., John, L., Hultgren, B., Huang, X., Renz, M., Stephan, J.P., Tsai, S.P., Powell-Braxton, L., French, D., et al. 2002. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. Endocrinology 143:1741-1747.

33. Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.X., and McKeehan, W.L. 2000. Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. J Biol Chem 275:15482-15489.

[0315]

[0316]

[0317] **B. FGF 수용체 4에 대한 항체의 인간화 동안 확인 및 제거된 고도로 특이적인 오프-표적 결합**

[0318] **물질 및 방법.**

[0319] FGFR4를 술포-NHS-LC-비오틴 (피어스(Pierce); cat 21335)을 사용하여 비오티닐화하였다.

[0320] *키메라 LD1의 생성* - 본원에 기재된 바와 같이, 인간 FGF 수용체 4 (FGFR4)의 세포외 도메인(기재된 바와 같이 CHO 세포에서 발현되고 정제됨[14])을 사용하여 balb/c 마우스를 면역화시켰다. 클론을 단백질-기반 ELISA에서 FGFR4에 대한 FGF19 결합을 차단하는 능력에 대해 스크리닝하였을 때 LD1을 발현하는 하이브리도마가 확인되었다.

[0321] 뮤린 LD1 가변 도메인은 표준 방법을 이용하여 LD1 생산 하이브리도마 세포로부터 추출된 총 RNA로부터 클로닝하였다. 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 불변 경쇄 (CL) 및 불변 중쇄 도메인 1 (CH1)에 대한 축퇴성 역방향 프라이머 및 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 특이적인 정방향 프라이머로 RT-PCR을 이용

하여 증폭시켰다. 이어서, 이들 가변 도메인을 각각의 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 함유하는 벡터에 인-프레임 클로닝하였다.

[0322] *LD1의 인간화 및 친화도 성숙* - LD1의 초가변 영역을 트라스투주맙에 사용되는 인간 카파 I (huKI) 및 인간 VH 하위군 III (huIII) 가변 도메인 프레임워크에 이식하였다. 프레임워크 복구를 이용하여 FGFR4 결합 친화도를 완전하게 복구하는 프레임워크 변화의 최소 조합이 확인될 때까지 마우스 버니어 위치의 첨가를 통해 FGFR4 결합 친화도를 최적화시켰다[33].

[0323] 파지 상에 1가 Fab-P3 융합체로 디스플레이된 hLD1.vB를 소프트 랜덤화 전략을 이용하여 친화도 성숙시켰다. 서열 다양성을 뮤린 초가변 영역 서열을 향하는 경향이 유지되도록 손상된 올리고뉴클레오티드 합성 전략을 이용하여 각각의 초가변 영역에 개별적으로 도입하였다[34]. 각각의 다양화된 위치에서, 야생형 아미노산을 코딩하는 코돈을 각각의 위치에서 평균 50 퍼센트 돌연변이 비율을 생성하는 뉴클레오티드의 70-10-10-10 혼합물로 손상시켰다.

[0324] hLD1.vB 다양화된 파지 라이브러리를 가용성 선별 방법을 이용하여 패닝하였다[35]. 이 접근법은 용액 중에서 낮은 농도의 비오티닐화 FGFR4와의 짧은 결합 기간에 이어 고정화된 뉴트라비딘 상의 FGFR4에 파지-결합된 짧은 5분 포획을 필요로 한다. 과량의 비표지된 FGFR4 (100 nM 초과)를 증가된 해리율 선별 엄격도를 위해 포획 단계 이전에 첨가하였다. 결합된 파지를 웰을 100 mM HCl과 30분 동안 인큐베이션함으로써 용리하고, 1 M 트리스, pH 8로 중화시키고, XL1-블루 세포 및 M13/KO7 헬퍼 파지를 사용하여 증폭시켰다. 파지 항체를 전장 IgG로 재구성하고, 포유동물 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0325] *친화도 결정* - 친화도 결정을 비아코어™-2000을 이용하는 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. 대략 50 RU의 hLD1.vB IgG를 10 mM 아세트산나트륨 pH 4.8 중에서 CM5 센서 칩 상에 고정화시키고, PBST 중 FGFR4의 일련의 2배 희석액 (0.48-1000 nM)을 30 μl/분의 유량으로 주사하였다. 각각의 샘플을 4분 회합 및 10분 해리로 분석하였다. 각각의 주사 후에 칩을 10 mM 글리신 pH 1.7을 사용하여 재생시켰다. 결합 반응은 유사한 밀도로 고정화된 비관련 IgG를 갖는 유동 세포로부터 RU를 감하여 보정하였다. kon 및 koff의 동시 핏팅의 1:1 랭뮤어 모델을 동역학적 분석에 이용하였다.

[0326] *이종이식편 실험* - 모든 동물 프로토콜은 제넨테크의 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받았다. 7주령의 암컷 *nu/nu* (누드-CRL) 마우스를 찰스 리버 래보러토리즈 인터내셔널로부터 수득하였다 (품종 코드 088). 마우스를 특정 병원균-무함유 조건 하에 유지하였다. HUH7 세포 (5 x 10^6개; 재팬 헬스 사이언스 리서치 리소시스 뱅크 (Japan Health science Research Resources Bank), cat JCRB0403)를 HBSS/매트리겔 (1:1 v/v; BD 바이오사이언시스, cat 354234) 중 0.2 mL의 부피로 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양을 캘리퍼로 매주 2회 측정하고, 종양 부피를 식: $V = 0.5 \times L \times W^2$ (여기서, L 및 W는 각각 종양의 길이 및 폭임)를 이용하여 계산하였다. 평균 종양 부피가 145 mm^3에 도달하였을 때, 마우스를 무작위적으로 분류하고 (n = 15), 비히클 (PBS), 30 mg/kg chLD1, 30 mg/kg hLD1.vB 또는 30 mg/kg hLD1.v22의 0.2 mL 복강내 주사로 매주 1회 처리하였다. 처리 후에, 종양 부피를 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 종양 성장 억제 퍼센트 (% TGI)를 하기 식을 이용하여 계산하였으며, 여기서 C = 대조 비히클 군의 제21일의 평균 종양 부피 및 T = 시험 처리된 마우스의 각각의 군으로부터의 제21일의 평균 부피이다: %TGI = 100 x ((C-T)/C). 데이터를 분석하고, 로그-등급 시험을 이용하여 JMP 소프트웨어, 버전 6.0 (SAS 인스티튜트(SAS Institute); 노스캐롤라이나주 캐리)으로 군 사이의 종양 배가 차이를 평가하였다. 데이터를 평균 종양 부피 ± SEM으로 제시하였다.

[0327] *마우스에서의 약동학적 연구* - NCR 누드 마우스는 타코닉(Taconic) (cat NCRNU)에서 공급하였다. C3 녹아웃 마우스[36]를 적어도 10 세대 동안 C57BL/6 마우스에 역교배시켰다. 자손을 이종 교배시켜 C3 녹아웃 마우스 및 야생형 대조군을 생성하였다. 이 연구에서, 이들은 각각 C3 ko 및 C3 wt 마우스로 지칭된다.

[0328] 15.5 내지 38.3 g 체중의 마우스에게 항-FGFR4 항체의 1, 5 또는 20 mg/kg (체중) IV 볼루스 용량을 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 혈액 샘플을 후안와 채혈 또는 심장 스틱을 통해 수집하고 (시점당 n=3 마우스), 혈청을 투여후 28일까지 선택된 시점에서 단리하였다. 혈청 샘플을 ELISA를 이용하여 항-FGFR4 항체 혈청 농도에 대해 검정할 때까지 -80℃에 저장하였다.

[0329] 항-FGFR4 항체 혈청 농도-시간 프로파일을 윈논린 엔터프라이즈(WinNonlin Enterprise) 버전 5.2.1 (파르사이트 코포레이션(Pharsight Corp.))을 이용하여 PK 파라미터를 추정하는데 이용하였다. 단일 농도-시간 프로파일을

각각의 군에 대해 결정하였으므로, 각각의 PK 파라미터의 하나의 추정값을 수득하고, 각각의 PK 파라미터의 핏의 표준 오차 (SE)와 함께 보고하였다. 각각의 군에 대해 투여된 정격 용량을 모델링에 사용하였다.

[0330] *방사성아이오딘화* - 항체를 간접 아이오도겐 첨가 방법을 이용하여 방사성아이오딘화시켰다[37]. 방사성표지된 단백질을 PBS 중에서 미리 평형화된 NAP5™ 칼럼 (지이 헬스케어 라이프 사이언시스(GE Healthcare Life Sciences), cat. 17-0853-01)을 이용하여 정제하였다. 시험관내 연구에 사용된 분자의 비활성은 chLD1의 경우에 14.38 μCi/μg 및 hLD1.vB의 경우에 15.05 μCi/μg이었다. 생체내 연구에 사용된 분자의 비활성은 chLD1의 경우에 12.52 μCi/μg 및 hLD1.vB의 경우에 9.99 μCi/μg이었다. 방사성아이오딘화 후에, 방사성아이오딘화된 항체를 무손상 및 비표지된 항체에 대해 대등한 항원 결합을 유지하는 상태로 크기-배제 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 ELISA에 의해 특성화하였다.

[0331] *시험관내 인큐베이션* - 혈청에서의 인큐베이션을 위해, 항체를 NCR 누드, C3 ko 또는 C3 wt 마우스 혈청[36], PBS + 0.5% BSA에 200 μg/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 분취액 (100 μl)을 제조하고, 37℃에서 부드럽게 회전시키면서 인큐베이션하였다. 샘플을 0, 4, 8, 24, 48 및 96시간에 드라이 아이스로 옮기고, ELISA 분석시까지 -70℃에 저장하였다.

[0332] 혈장에서의 인큐베이션을 위해, 항체를 시노몰구스 원숭이, 인간, 래트 (바이오리클레메이션 엘엘씨(Bioreclamation LLC), 각각 cat. CYNPLLIHP, HMLLIHP 및 RATPLLIHP) 및 NCR 누드 마우스 혈장 (타코닉, cat NCRNU-E) 및 PBS + 0.5% BSA에 200 μg/ml의 최종 농도로 ± ^{125}I-항체에 5 x 10^6 CPM/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 분취액 (100 μl)을 제조하고, 37℃에서 부드럽게 회전시키면서 인큐베이션하였다. 0, 24 및 48시간에 샘플을 드라이 아이스로 옮기고, 크기-배제 HPLC (^{125}I-항체 + 비표지된 항체 샘플)에 의한 분석시까지 또는 단백질-G 추출에 이어 SDS-PAGE (비표지된 항체 샘플)를 수행할 때까지 -70℃에 저장하였다.

[0333] *조직 분포 연구* - 암컷 NCR 누드 마우스에게 300 μCi/kg의 ^{125}I-chLD1 ± 20 mg/kg의 비표지된 chLD1 또는 300 μCi/kg의 ^{125}I-hLD1.vB ± 20 mg/kg의 비표지된 hLD1.vB의 IV 볼루스 용량을 투여하였다. 혈액을 투여후 15분 및 2, 5, 24, 72 및 120시간에 수집하고, 혈청을 위해 처리하였다. 혈청을 크기-배제 HPLC에 의한 분석시까지 및 단백질-G 추출에 이어 SDS-PAGE 분리를 수행할 때까지 -70℃에 동결시켰다. 총 방사성 카운트를 또한 왈락 1480 위저드 3"(Wallac 1480 Wizard 3") (EC&G 왈락, cat. 1480-011)을 이용하여 수득하였다. 간, 폐, 신장 및 심장을 투여후 2, 72 및 120시간에 수집하고, 총 방사능에 대한 분석시까지 -70℃에 동결시켰다. 모든 동물은 IACUC 지침에 따라 다루었다.

[0334] *IgG 및 FGFR4 ELISA* - FGFR4 특이적 IgG를 FGFR4 ELISA를 이용하여 측정하였다. FGFR4를 마이크로타이트 플레이트 상에 고정화시키고, 매직(Magic) 완충제 + 0.35M NaCl (1x PBS pH 7.4, 0.5% BSA, 0.05% 트윈-20, 0.25% Chaps, 5mM EDTA, 0.2% BgG, 0.35M NaCl, 15ppm 프로클린)에 희석된 LD1 표준물 (chLD1, hLD1.vB 또는 hLD1.v22) 및 샘플을 첨가하고, 포획 IgG를 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP, 잭슨, cat# 109-036-098)에 접합된 $F(ab')_2$ 염소 항-huIgG Fc로 검출하였다.

[0335] 총 항체를 인간 Fc ELISA를 이용하여 $F(ab')_2$ 토끼 항-huIgG Fc (잭슨, cat# 309-006-008)로 코팅된 마이크로타이터 플레이트 상에서 희석된 샘플을 인큐베이션함으로써 결정하고, HRP (잭슨, cat# 109-036-098)에 접합된 $F(ab')_2$ 염소 항-huIgG Fc로 검출하였다. TMB 퍼옥시다제 기질 용액을 발색을 위해 사용하고 (모스(Moss), cat# TMBE-1000), 1M H_3PO_4를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 (바이오텍(Biotek) EL311 또는 등가물) 상에서 450/620 nm에서 판독하였다.

[0336] *크기-배제 HPLC* - 크기-배제 HPLC를 PBS 중에서 페노메넥스(Phenomenex)™ BioSep-SEC-S 3000 칼럼 (300 × 7.8 mm, 5μm 칼럼 (토런스(Torrance), cat. 00H-2146-K0))을 이용하여 pH 4.0 및 pH 7.0에서 출발하는 샘플로 수행하였다. pH 7.0의 샘플은 PBS에 희석하였고; pH 4.0의 샘플은 200 mM 시트르산, pH 3.0으로 pH를 낮추어 제조하였다. 유량은 30분 동안 0.5 ml/분 (등용매성)이었다. 켐스테이션(ChemStation) 아날로그->디지털 전환기는 25,000 단위/mV, 피크 폭 2초, 슬릿 4 nM으로 설정하였다 (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies); cat 35900E). 방사능은 레이테스트 라모나 90(raytest Ramona 90) (레이테스트 USA 인크.(raytest USA Inc.); 노스캐롤라이나주 윌밍톤)으로 표준 애질런트 1100 HPLC 모듈 시스템 (캘리포니아주 산

타 클라라)에 따라 검출하였다.

[0337] 단백질-G 비드 추출 및 SDS-PAGE 분리 - 트리톤 X-100 (1% (v/v)의 최종 농도)을 크기-배제 HPLC로부터 수집된 분획에 첨가한 후에 단백질-G 비드 (GE 라이프사이언시스 인크(GE Lifesciences Inc), cat. 17-0885-01)를 첨가하였다. 샘플을 밤새 4℃에서 부드럽게 회전시키면서 인큐베이션한 후에, 비드를 PBS + 1% 트리톤 X-100으로 4회 세척하였다. 각각의 샘플을 분리하고, 샘플의 절반을 NuPage® 샘플 환원제 (cat. NP0004)를 사용하여 환원시켰다. 비드를 NuPAGE® 4x LDS 샘플 완충제 (pH 8.4) (cat. NP00007) ± NuPAGE® 샘플 환원제로 처리하고, 99℃에서 5분 동안 인큐베이션한 후에; NuPAGE® 4-12% 비스-트리스 겔 (cat. NP0321BOX)에 NuPAGE® 1x MOPS SDS 전개 완충제 (cat. NP0001)와 함께 적용하였다. 겔을 쿠마시 블루(Coomassie Blue) R250 염료로 염색하였다. 모든 NuPAGE® 시약은 인비트로젠, 코포레이션(Invitrogen, Corp.)으로부터 수득하였다.

[0338] 질량 분광측정 및 생물정보학 분석 - SDS-PAGE로부터 절제한 샘플을 이전에 기재된 바와 같이 처리하였다[38]. 간략하게, 빠른 용액중 마이크로웨이브-보조 트립신 소화 후에 펩티드를 역상 크로마토그래피에 의해 분리하고, 2 kV의 분사 전압으로 나노분사 이온화 공급원으로 직접 용리하고, LTQ XL-오비트랩(Orbitrap) 질량 분광계 (써모피셔(ThermoFisher))를 이용하여 분석하였다. 전구체 이온을 FTMS에서 60,000 해상도로 분석하였다. MS/MS를 LTQ에서 데이터 의존성 방식으로 작동하는 기기로 수행하였으며, 이에 의해 상위 10개의 가장 풍부한 이온이 단편화되었다. 데이터를 마스코트 서치 알고리즘(Mascot Search Algorithm) (매트릭스 사이언시스(Matrix Sciences))을 이용하거나 또는 새로운 해석법에 의해 검색하였다.

[0339] 마스코트 데이터 검색에 대해: 검색 기준은 20 ppm의 완전한 MS 허용성, Lys 상에 GlyGly를 갖는 0.5 Da의 MS/MS 허용성, 메티오닌의 산화, Cys 상의 +57 Da 및 3개까지의 잘못된 절단을 갖는 가변 변형으로서의 ST 및 Y의 인산화를 포함하였다. 데이터를 스위스프롯(Swissprot) 데이터베이스의 포유동물 하위세트에 대해 검색하였다.

[0340] *결과*

[0341] ***LD1의 인간화 및 특성화.*** 인간 키메라 항체 LD1 (chLD1)은 HUH7 인간 간세포성 암종 (HCC) 이종이식편 모델에서 인간 FGFR4에 결합하고, FGF19 및 다른 FGF 리간드에 의한 신호전달을 차단하고, 종양 성장을 저해하는 것으로 밝혀졌다[14]. LD1의 인간화의 첫번째 단계로서, chLD1의 가변 경쇄 및 중쇄 도메인을 트라스투주맙에 사용된 인간 카파 I (huKI) 및 인간 VH 하위군 III (huIII) 가변 도메인 프레임워크와 정렬시켰다 (도 10). chLD1로부터의 초가변 영역을 이들 인간 가변 프레임워크로 이식하여 직접적인 CDR-이식편 (hLD1.vA)을 생성하였다[15, 16]. FGFR4에 대한 결합에 대해 표면 플라즈몬 공명으로 chLD1과 비교하였을 때, hLD1.vA의 친화도는 약 5배 감소하였다 (나타내지 않음). 가변 경쇄 및 중쇄 도메인 둘 다의 다양한 버니어 위치에서의 마우스 서열의 치환을 결합을 개선하기 위한 수단으로 연구하여, LC에서 3개의 중요한 마우스 버니어 위치: P44F, L46I 및 Y49S를 확인하였다. 이들 변화는 FGFR4에 대해 chLD1과 대등한 친화도를 갖는 hLD1.vB에 혼입되었다 (표 3).

[0342] <표 3>

[0343] 항-FGFR4 항체 변이체의 결합 동역학. 고정화된 항체 변이체에 대한 인간 FGFR4 결합의 회합률 및 해리율은 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 측정하였다.

[0344]

LD1 Ab	kd (nM)	k*on* (M•sec-1)	k*off* (sec-1)
chLD1	0.45	3.82e5	1.73e-4
hLD1.vB	0.97	2.88e5	2.80e-4
hLD1.v22	.043	9.10e5	3.90e-5

[0345] 놀랍게도, 유사한 FGFR4 결합 친화도에도 불구하고 (도 11a), hLD1.vB는 *nu/nu* 마우스에서의 HUH7 인간 HCC 이종이식편 모델에서 chLD1에 비해 항-종양 효능을 감소시켰다 (도 11b). 9일 후에, PBS로 처리된 마우스의 HUH7 종양은 대략 700 mm^3의 평균 부피로 성장하였다. chLD1 처리된 군에서, 평균 HUH7 종양 부피는 대략 400 mm^3이었으며, 이는 PBS-처리된 동물에서의 종양에 비해 종양 성장의 43% 억제를 나타낸다. 그러나, hLD1.vB로 처리된 마우스에서의 평균 종양 부피는 대략 600 mm^3이었으며, 이는 PBS-처리된 동물에서의 종양에 비해 종양 성장

의 14% 억제를 나타낸다.

[0346] 무흉선 NCR 누드 마우스에서 수행한 chLD1 및 hLD1.vB의 약동학적 평가는 1 mg/kg IV의 chLD1 및 hLD1.vB 둘 다에 대해 빠른 제거율 (각각 140 및 132 mL/일/kg)을 밝혀내었으며, 이는 표적 매개된 제거 메커니즘을 제안한다. 이 제거 메커니즘은 chLD1의 경우에 20 mg/kg의 보다 높은 용량에서 포화될 것으로 보였다. 이 용량에서 관찰된 제거율 (11.7mL/일/kg; 도 11c)은 마우스에서 전형적인 인간화 항체에 대해 관찰된 표적-비의존성 제거의 범위 (6-12mL/일/kg) 내에 있었다 (참고문헌 17 및 피. 테일(P. Theil) 개인 통신). 그러나, hLD1.vB는 계속 빠르게 제거되었다 (34.2 mL/일/kg; 도 11c). 이는 hLD1.vB에 대한 추가의 제거 메커니즘이 마우스 이종이식편 모델에서 효능의 명백한 결핍의 원인일 수 있다는 것을 시사한다.

[0347] PK 발견과 일치하게, ^{125}I-chLD1 및 ^{125}I-hLD1.vB를 사용한 생체분포 연구가 유의하게 상이한 분포 프로파일을 밝혀내었다 (도 11d). ^{125}I-chLD1은 간세포 상에서의 FGFR4의 높은 발현으로 인해 간에 빠르고 특이적으로 분포된 반면, 오직 제한된 양의 ^{125}I-hLD1.vB만이 동등한 용량에서 2시간까지 간에서 발견되었다 (~80 vs. 35% ID/g). 대조적으로, 이들 항체의 관찰된 분포가 혈액에서는 그 반대였으며, 이는 경쟁 상호작용이 전반적인 방사능 손실로 이어지는 생체내에서의 항체 안정성의 손실과는 대조적으로 hLD1.vB의 간으로의 분포를 방지한다는 것을 시사한다.

[0348] *C3 간섭의 확인*. chLD1 및 hLD1.vB 사이에 관찰된 생체내 차이를 조정하기 위한 노력으로, 본 발명자들은 혈장에서의 항체 안정성 뿐만 아니라 이들의 기능에 영향을 미칠 수 있는 잠재적 오프-표적 혈장 또는 조직 상호작용을 평가하였다. chLD1 또는 hLD1.vB를 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간 혈장 중에서 48시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후에 FGFR4 결합 활성 및 총 인간 IgG 농도를 둘 다 평가하여 혈장 안정성을 평가하였다. IgG ELISA에 의해 측정된 바와 같이 총 chLD1 또는 hLD1.vB 농도는 변화하지 않는 한편 (나타내지 않음), FGFR4 ELISA에 의해 검출된 hLD1.vB의 회수는 마우스 및 래트 혈장에서 PBS/BSA에서의 대조군 인큐베이션에 비해 유의하게 (~30%까지) 감소하였다 (도 12a). 대조적으로, 어떠한 시험된 조건에서도 chLD1 FGFR4 결합 활성은 손실되지 않았다. hLD1.vB 회수 (특히 설치류 혈장으로부터 회수)의 유의한 감소는 손실이 퇴화 때문이 아니라 설치류 혈장에서의 간섭 복합체의 형성 때문일 가능성이 더 크다는 것을 제안한다. hLD1.vB의 마우스 혈장과의 상호작용이 고분자량 복합체를 생성할 수 있으므로, 아이오딘화된 chLD1 및 hLD1.vB를 또한 혈장에서 인큐베이션하고, 크기-배제 HPLC를 이용하여 분석하였다. 고분자량 피크는 오직 ^{125}I-hLD1.vB를 함유하는 마우스 혈장 샘플에서만 검출되고, ^{125}I-chLD1은 그렇지 않았다. 150 kDa에서 예상된 항체 피크 뿐만 아니라, 약 270 및 약 550 kDa에 상응하는 피크가 또한 초기에 검출되었으나 (도 12b), 48시간까지는 오직 150 및 270 kDa 피크만이 남아있었고; 550 kDa 피크는 더 이상 관찰되지 않았다. 이들 고분자량 피크는 hLD1.vB를 함유하는 시노몰구스 원숭이 및 인간 혈장 또는 PBS/BSA 또는 chLD1을 함유하는 임의의 샘플에서 검출되지 않았다 (도 15). 흥미롭게도, 이들 고분자량 피크의 존재는 FGFR4 ELISA에서 수득한 항체 회수 데이터와 직접 관련이 있었다. 또한, 이들 피크의 존재는 분석을 pH 4.0에서 수행하였을 때 감소하였으며 (도 15), 이는 마우스 혈청과의 hLD1.vB 의존성 상호작용을 추가로 뒷받침한다.

[0349] 마우스 혈장의 면역침전은 hLD1.vB을 사용하여 선택적으로 강하된 약 37 kDa 단백질을 나타내었으나, chLD1은 그렇지 않았다 (도 12c). 크기-배제 HPLC로부터의 발견과 일치하게, 이 37 kDa 단백질 밴드는 래트 혈장 샘플에서 관찰되었으나 시노몰구스 원숭이 및 인간 혈장 샘플에서는 관찰되지 않았다 (도 16a-c). 또한, 단백질은 hLD1.vB가 투여된 마우스로부터의 혈장에서 검출되었다 (도 16d). 37 kDa 마우스 혈장 단백질에서 유래된 트립신 펩티드의 MS/MS 분석에서 이 밴드는 마우스 보체 C3에서 유래된 것으로 확인되었다 (도 12d). C3의 직접적인 관련은 C3 녹아웃 (ko) 마우스로부터의 혈장에서 인큐베이션된 hLD1.vB의 완전한 회수에 의해 뒷받침된다 (도 17).

[0350] *C3 결합의 친화도 성숙 및 재평가*. chLD1 및 hLD1.vB는 둘 다 동일한 인간 불변 영역 및 상보성 결정 영역 (CDR)을 공유하고, 이에 따라 오직 이들의 가변 도메인 프레임워크만이 상이하다. 또한, hLD1.vB의 인간화에 사용되는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 프레임워크는 마우스 혈청 단백질과 상호작용을 나타내는 것으로 보고된 적이 없는 트라스투주맙을 포함한 여러 인간화 항체와 매우 높은 정도의 상동성을 공유한다. 따라서, hLD1.vB의 마우스 C3과의 오프-표적 상호작용은 마우스 LD1 CDR의 인간 가변 도메인 프레임워크와의 특정한 조합으로부터 생성될 가능성이 가장 높다.

[0351] 본 발명자들은 hLD1.vB의 CDR 서열에서의 변화 중 일부 (파지 상에 디스플레이된 Fab 단편의 친화도 성숙으로부

터 생성됨)가 마우스 C3 결합의 손실과 함께 FGFR4에 대한 친화도를 개선할 수 있을 것으로 생각하였다. 파지 선별된 변이체를 IgG로서 발현시키고, FGFR4 결합 친화도 뿐만 아니라 마우스 C3과의 잠재적 상호작용에 대해 SDS-PAGE 분석에 커플링된 면역침전 검정을 이용하여 스크리닝하였다. hLD1.vB에 비해 CDR-H2에서 3개의 아미노산 변화 (H52L, S53V 및 D60E, 도 10)를 갖는 하나의 변이체인 hLD1.v22는 FGFR4에 대해 개선된 결합 친화도 (표 3) 및 보체 C3에 대한 결합의 손실을 둘 다 나타내었다 (도 13b).

[0352] 마우스 보체 C3이 생체내에서 hLD1.vB 및 hLD1.v22의 제거를 변경하는 정도를 약동학적 연구에서 C3 ko 마우스를 C3 wt 마우스에 비교하여 평가하였다 (20 mg/kg). NCR 마우스에서 이전에 관찰된 바와 같이, hLD1.vB는 C3 wt 마우스에서의 순환계로부터 빠르게 제거되지만 (29 mL/일/kg); chLD1 및 hLD1.vB는 둘 다 C3 ko 마우스에서 유사한 약동학적 프로파일 (각각 8.7 및 9.3 mL/일/kg의 제거율)을 갖는다 (도 14a 및 표 4).

[0353] <표 4>

[0354] 20 mg/kg IV로 투여된 항-FGF.R4 변이체의 약동학적 파라미터

c	AUC (일*ug/mL)	Cmax (ug/mL)	CL (mL/일/kg)	베타 HL (일)	V1 (mL/kg)	Vss (mL/kg)
chLD1 C3 ko	2294 (203)	483 (42)	8.7 (0.77)	7.1 (1)	41 (3.6)	86 (6.8)
hLD1.vB C3 ko	2143 (161)	530 (51)	9.3 (0.70)	5.9 (0.6)	38 (3.6)	78 (5.1)
chLD1 C3 wt	2937 (325)	489 (62)	6.8 (0.76)	7.9 (1.3)	41 (5.2)	76 (6.9)
hLD1.vB C3 wt	688 (48)	376 (30)	29 (2.06)	2.5 (0.3)	53 (4.2)	97 (8.8)
chLD1 NCR 누드	1696 (85)	335 (21)	11.8 (0.59)	5.8 (0.4)	60 (3.7)	97 (4.5)
hLD1.vB NCR 누드	428 (22)	256 (15)	46.7 (2.46)	2.3 (0.2)	78 (4.6)	139 (9.9)
hLD1.v22 NCR 누드	1777 (119)	338 (24)	11.3 (0.75)	6.5 (0.6)	59 (4.1)	103 (5.6)

[0355]

[0356] 이들 데이터는 조직 분포 데이터와 일치하고, 생체내에서 마우스 보체 C3과의 특이적 상호작용이 hLD1.vB를 빠르게 제거한다는 것을 확인한다. hLD1.vB의 제거율이 C3 ko 마우스에서 유의하게 개선되고, hLD1.v22가 C3에 결합하지 않으므로, 본 발명자들은 hLD1.v22가 NCR 누드 마우스에서 chLD1과 유사한 약동학적 프로파일을 가질 것으로 예상하였다. 도 14b에 도시된 바와 같이, chLD1 및 hLD1.v22의 제거율은 NCR 누드 마우스에서 유사하며 (각각 11.8 및 11.3 mL/일/kg), 이는 hLD1.vB가 빠르게 제거된다는 (46.7 mL/일/kg) 본 발명자들의 이전의 발견과 일치한다.

[0357] hLD1.v22가 HUH7 HCC 이종이식편 모델에서 종양 성장을 억제하는 능력을 chLD1 및 hLD1.vB와 비교하여 평가하였다. 21일 후에, PBS로 처리된 마우스의 HUH7 종양은 대략 2,100 mm^3의 평균 부피로 성장하였다 (도 14c). PBS-처리된 군의 15마리 동물 중에서, 3마리가 종양 부피 제한 (대략 2,500 mm^3)으로 인해 연구 종결 전에 안락사되었다. hLD1.vB 처리된 군에서, 평균 HUH7 종양 부피는 대략 1,200 mm^3이었으며, 이는 PBS-처리된 동물에서의 종양에 비해 종양 성장의 43% 억제를 나타낸다. 그러나, hLD1.v22로 처리된 마우스에서의 평균 종양 부피는 대략 530 mm^3이었다. 이 결과는 평균 HUH7 종양 부피가 대략 350 mm^3인 chLD1 처리된 마우스와 대등하였다. hLD1.v22 및 chLD1 처리된 군 둘 다의 경우에, 이는 종양 크기가 PBS 비히클 처리군에 비해 각각 75% 및 83% 감소하였음을 나타낸다. hLD1.vB (12.2일), hLD1.v22 (15.8일) 또는 chLD1 (17.1일)로 처리된 군의 종양 배가 시간은 PBS-처리된 군 (8.2일)에서보다 유의하게 길었다. 추가로, hLD1.v22 또는 chLD1-처리된 군의 종양 배가 시간은 hLD1.vB 처리된 군보다 유의하게 더 길었다. hLD1.vB에 비해 hLD1.v22 및 chLD1 둘 다의 유사한 생체내 성능은 마우스 보체 C3과의 특이적 오프-표적 상호작용이 제거율을 증가시켜 노출을 적게 하고, hLD1.vB의 효능을 감소시킨다는 것을 강력하게 시사한다.

[0358] 따라서, 항-FGFR4 항체 hLD1.v22의 생성은 하기 단계를 갖는다: 1) LD1의 뮤린 VL 및 VH 도메인 및 인간 IgG1 불변 도메인을 함유하는 인간 키메라 LD1 (chLD1)의 생성; 2) chLD1로부터의 6개의 뮤린 HVR의 인간 VL 카파 I 및 인간 VH 하위군 III 가변 도메인 프레임워크으로의 이식 (직접적-HCR 이식편을 생성하고, 항체 hLD1.vA를 생성함). 항체 hLD1.vA는 ChLD1보다 약 5배 적게 FGFR4에 결합한다; 3) 항체 hLD1.vB를 생성하는 경쇄 돌연변이 P44F, L46I 및 Y49S의 도입. 항체 hLD1.vB는 인간 FGFR4에 항체 chLD1보다 약 2배 더 약하게 결합하였으나, hLD1.vB는 chLD1에 비해 생체내에서 종양 효능을 감소시키고, 생체내에서 빠르게 제거되며, 마우스 보체 단백질 C3에 결합하는 것으로 밝혀졌다; 4) 친화도 성숙을 수행하였으며, HVR H2에 대한 3개의 변화 (H52L, S53V, D60E)의 첨가는 FGFR4에 대한 결합 친화도를 개선하고, 마우스 보체 c3 단백질에 대한 결합을 제거하였다. 생성된 인간화 및 친화도 성숙 항체인 항체 hLD1.v22는 chLD1과 대등한 생체내 효능, pK 및 조직 분포를 갖는다. 또한, 항체 hLD1.v22는 예를 들어 인간 이종이식편 종양 연구에서 암을 억제하는데 있어 모 chLD1 항체와 적어도 대등한 생물학적 활성을 갖는 것으로 결정되었다.

[0359] 부분 참고문헌 목록

1. James LC, Roversi P, Tawfik DS. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. Science 2003; 299:1362-7.

2. Krishnan L, Sahni G, Kaur KJ, Salunke DM. Role of antibody paratope conformational flexibility in the manifestation of molecular mimicry. Biophys J 2008; 94:1367-76.

3. Notkins AL. Polyreactivity of antibody molecules. Trends Immunol 2004; 25:174-9.

4. Thorpe IF, Brooks CL, 3rd. Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:8821-6.

5. Yin J, Beuscher AEt, Andryski SE, Stevens RC, Schultz PG. Structural plasticity and the evolution of antibody affinity and specificity. J Mol Biol 2003; 330:651-6.

6. Thielges MC, Zimmermann J, Yu W, Oda M, Romesberg FE. Exploring the energy landscape of antibody-antigen complexes: protein dynamics, flexibility, and molecular recognition. Biochemistry 2008; 47:7237-47.

7. Feyen O, Lueking A, Kowald A, Stephan C, Meyer HE, Gobel U, et al. Off-target activity of TNF-α inhibitors characterized by protein biochips. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2008; 391:1713-20.

8. Kijanka G, Ipcho S, Baars S, Chen H, Hadley K, Beveridge A, et al. Rapid characterization of binding specificity and cross-reactivity of antibodies using recombinant human protein arrays. J Immunol Methods 2009; 340:132-7.

9. Lueking A, Beator J, Patz E, Mullner S, Mehes G, Amersdorfer P. Determination and validation of off-target activities of anti-CD44 variant 6 antibodies using protein biochips and tissue microarrays. Biotechniques 2008; 45:Pi-v.

10. Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. J Mol Biol 2007; 368:652-65.

11. Rosenwald S, Kafri R, Lancet D. Test of a statistical model for molecular recognition in biological repertoires. J Theor Biol 2002; 216:327-36.

12. James LC, Tawfik DS. The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness. Protein Sci 2003; 12:2183-93.

[0360]

13. Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W, Schneider-Mergener J. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. Cell 1997; 91:799-809.

14. French DM, Lin BC, Wang M, Hötzel K, Bolon B, Ferrando R, et al. Targeting FGFR4 Inhibits Hepatocellular Carcinoma in Preclinical Animal Models. J Clin Invest 2011; Submitted.

15. Dennis MS. Humanization by CDR Repair In: Shire S, Gombotz W, Bechtold-Peters K, Andya J, eds. Pharmaceutical Aspects of Monoclonal Antibodies. New York: Co-published by the Association for Pharmaceutical Scientists & Springer, 2010:9-28.

16. MacCallum RM, Martin ACR, Thornton JT. Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. Journal of Molecular Biology 1996; 262:732-45.

17. Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, et al. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. Cancer Immunol Immunother 2006; 55:717-27.

18. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Mol Cells 2005; 20:17-29.

19. Lutz HU, Jelezarova E. Complement amplification revisited. Mol Immunol 2006; 43:2-12.

20. Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. Immunological Reviews 2001; 180:35-48.

21. Manderson AP, Pickering MC, Botto M, Walport MJ, Parish CR. Continual low-level activation of the classical complement pathway. Journal of Experimental Medince 2001; 194:747-56.

22. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. The Journal of Immunology 2006; 176:1305-10.

23. Sahu A, Pangburn MK. Covalent attachment of human complement C3 to IgG. The Journal of Biological Chemistry 1994; 269:28997-9002.

24. Vidarte L, Pastor C, Mas S, Blazquez AB, de los Rios V, Guerrero R, et al. Serine 132 is the C3 covalent attachment point on the CH1 domain of human IgG1. J Biol Chem 2001; 276:38217-23.

[0361]

25. Osmers I, Szalai AJ, Tenner AJ, Barnum SR. Complement in BuB/BnJ mice revisited: serum C3 levels and complement opsonic activity are not elevated. Mol Immunol 2006; 43:1722-5.

26. Otte L, Knaute T, Schneider-Mergener J, Kramer A. Molecular basis for the binding polyspecificity of an anti-cholera toxin peptide 3 monoclonal antibody. J Mol Recognit 2006; 19:49-59.

27. Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuck S, Chupeeva V, Mirzabekov A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. Analytical Biochemistry 2000; 278:123-31.

28. Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detected protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, and protein-ligand interactions. Nucleic Acids Research 2000; 28:i-vii.

29. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 1991; 251:767-73.

30. Forster R, Valin M, Lemarchand T, Palate B, Fifre A. Validation of tissue cross reactivity (TCR) studies: Tissue cross reactivity of anti-human CD209 in cynomolgus tissues. Toxicology Letters 2009; 189:S100-S.

31. Kallioniemi O-P, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Human Molecular Genetics 2001; 10:657-62.

32. Lynch C, Grewel I. Preclinical safety evaluation of monoclonal antibodies. In: Chernajovsky Y, Nissim A, eds. Therapeutic Antibodies: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer-Verlag, 2008:19-44.

33. Dennis MS. CDR Repair: A novel approach to antibody humaization. In: Shire SJ, Gombotz W, Bechtold-Peters K, Adndya J, eds. Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing. New York: Springer, 2010:9-28.

34. Gallop MA, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SPA, Gordon EM. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. J Med Chem 1994; 37:1233-51.

35. Lee CV, Liang W-C, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. J Mol Bio 2004; 340:1073-93.

[0362]

36. Circolo A, Garnier G, Fukuda W, Wang X, Hidvegi T, Szalai AJ, et al. Genetic disruption of the murine complement C3 promoter region generates deficient mice with extrahepatic expression of C3 mRNA. Immunopharmacology 1999; 42:135-49.

37. Chizzonite R, Truitt T, Podlaski FJ, Wolitzky AG, Quinn PM, Nunes P, et al. IL-12:Monocloncal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biological activity on activated human lymphoblasts. The Journal of Immunology 1991; 147:1548-56.

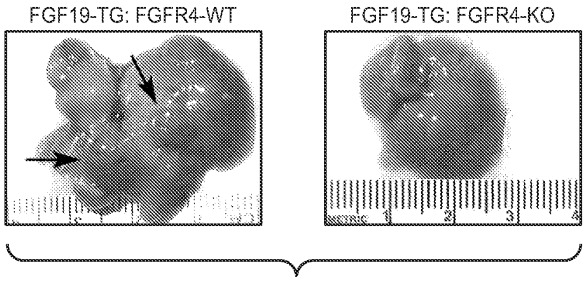
38. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. Cell 2009; 137:721-35.

[0363]

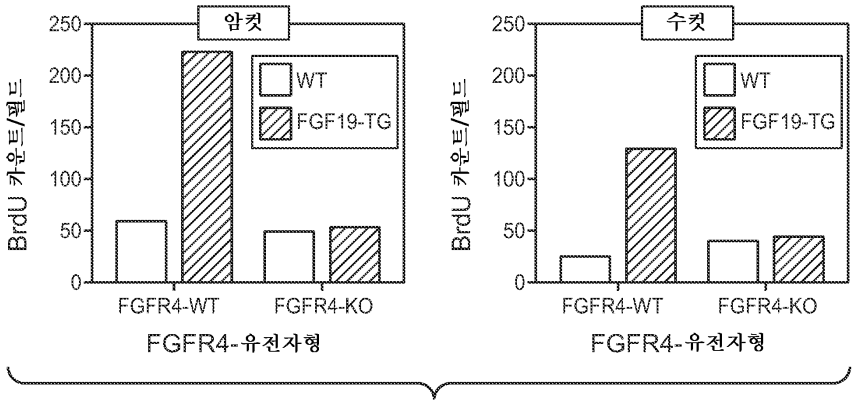
[0364] 상기 본 발명이 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 예시 및 실시예로서 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그의 전체가 명백하게 참고로 포함된다.

도면

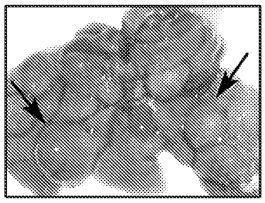
도면1a



도면1b



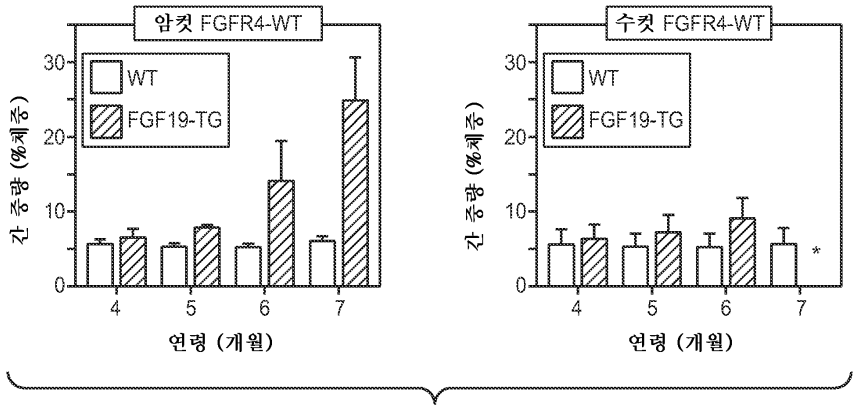
도면1c



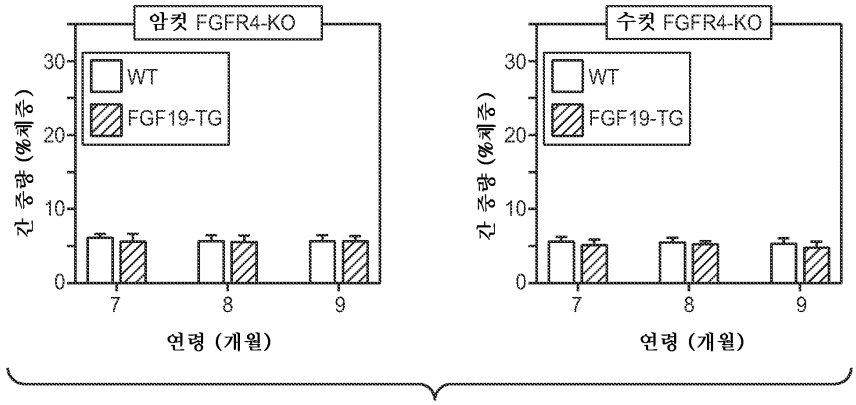
도면1d

연령 (개월)	성별	종양의 총체적 증거	종양의 조직학적 증거
4	F	9/10	10/10
	M	9/10	10/10
5	F	10/10	10/10
	M	9/10	10/10
6	F	10/10	10/10
	M	10/10	10/10
7	F	10/10	10/10
	M	6/6	6/6

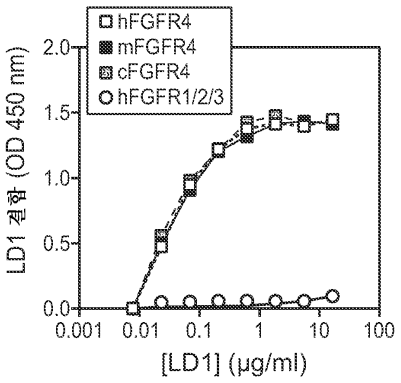
도면1e



도면1f



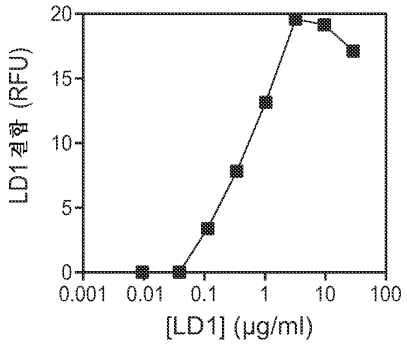
도면2a



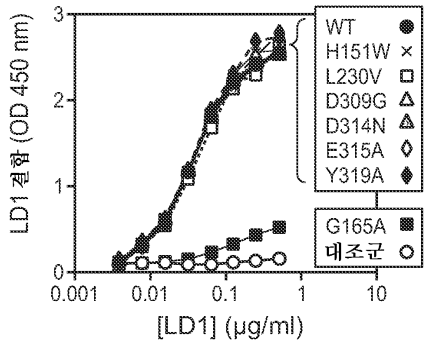
도면2b

FGFR4 종	Kd (nM)
마우스	0.7
시노몰구스	0.8
인간	0.7

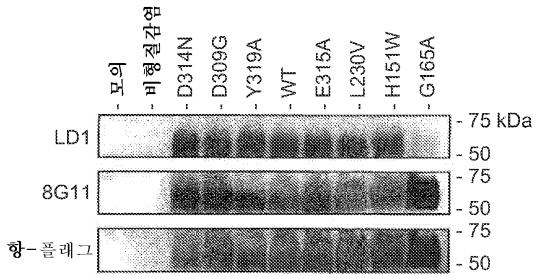
도면2c



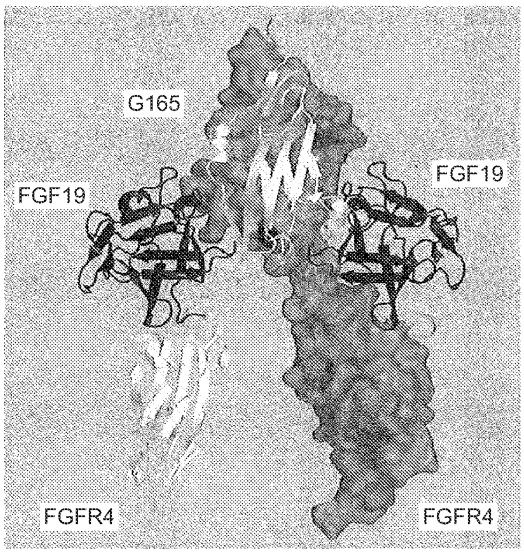
도면2d



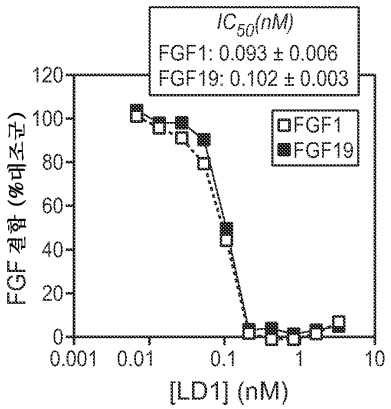
도면2e



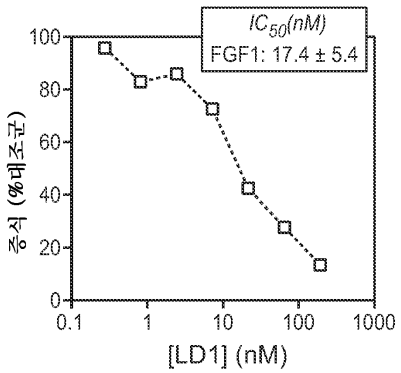
도면2f



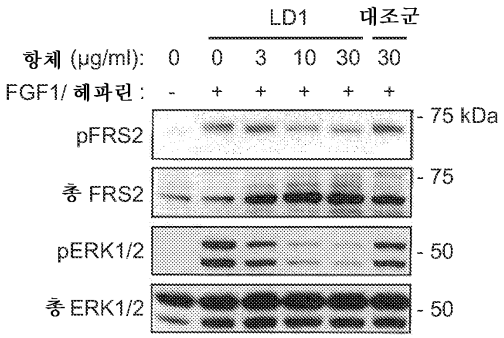
도면3a



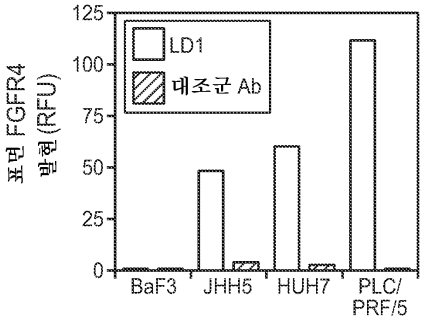
도면3b



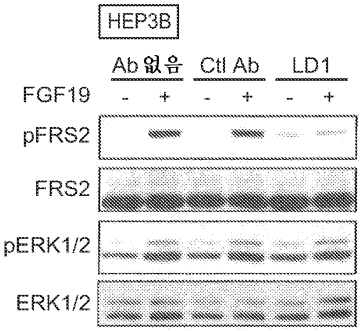
도면3c



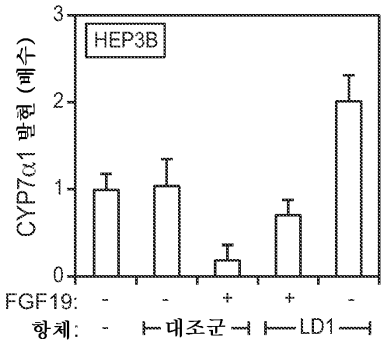
도면3d



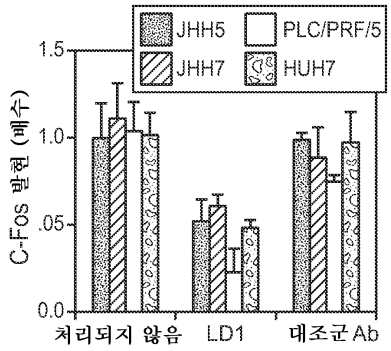
도면4a



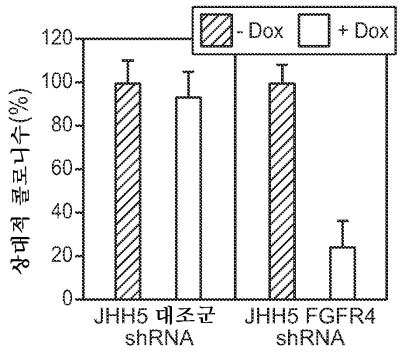
도면4b



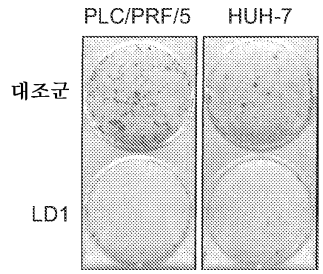
도면4c



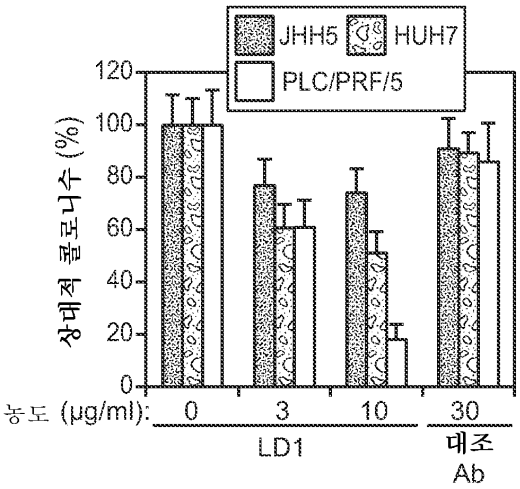
도면4d



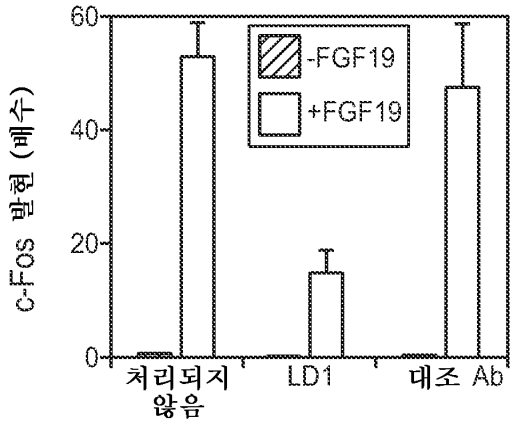
도면4e



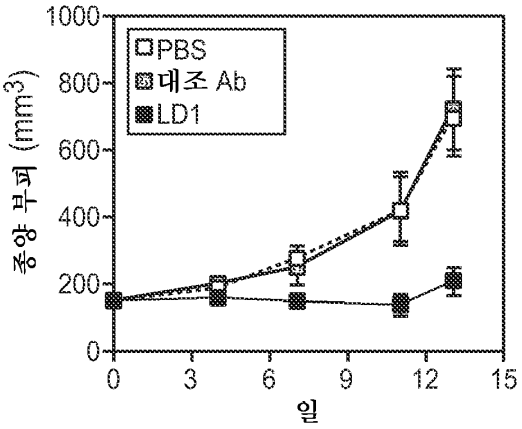
도면4f



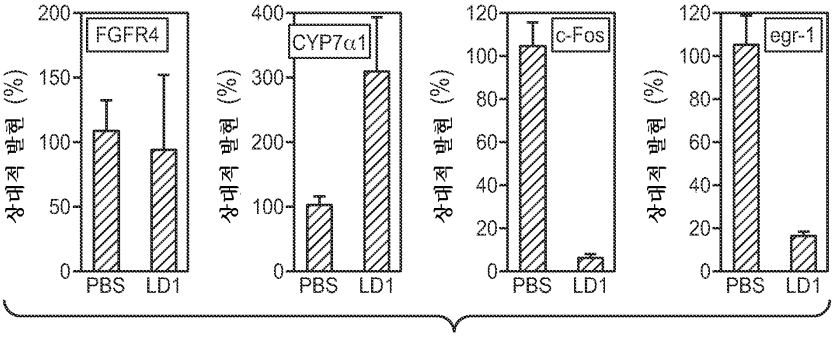
도면5a



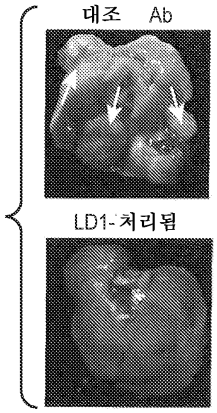
도면5b



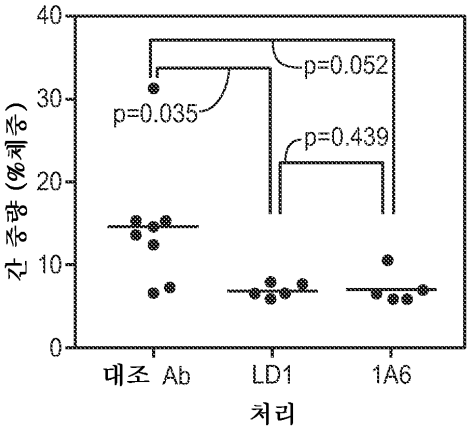
도면5c



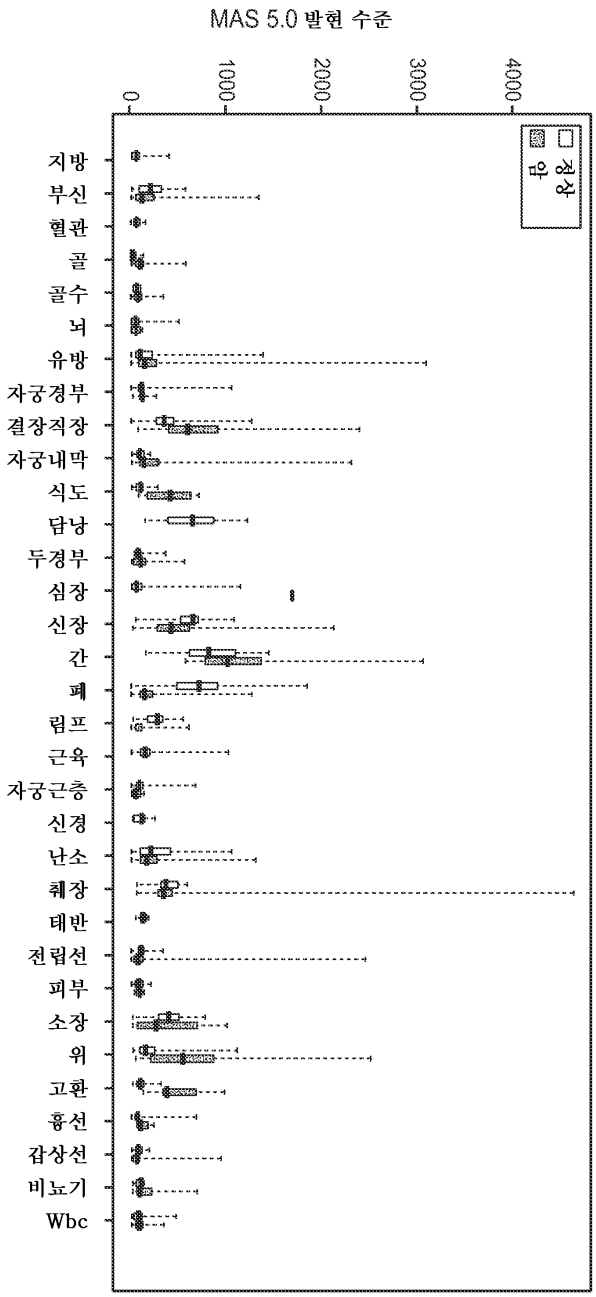
도면5d


대조 Ab
LD1-처리됨

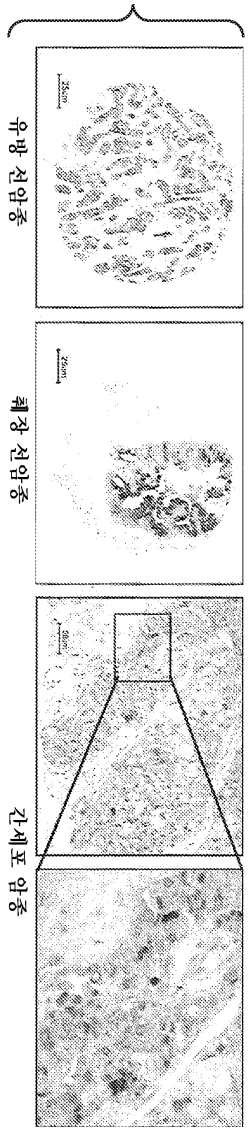
도면5e


40
30
20
10
0
간 중량 (%체중)
p=0.052
p=0.035
p=0.439
대조 Ab
LD1
1A6
처리

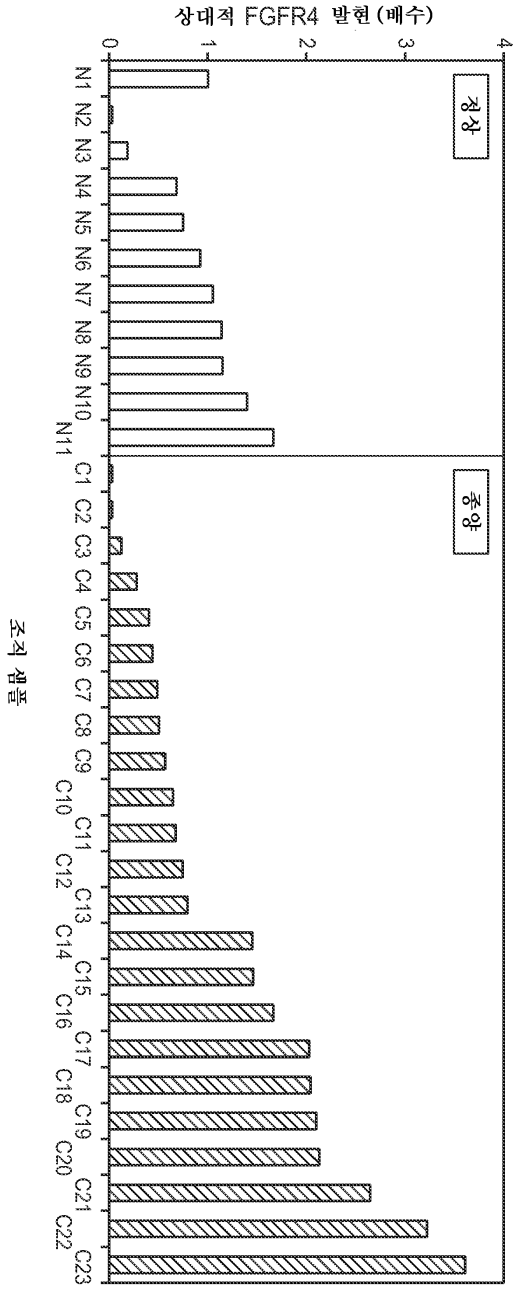
도면6a


MAS 5.0 발현 수준
4000
3000
2000
1000
0
정상
암
지방
부신
혈관
골
골수
뇌
유방
자궁경부
결장직장
자궁내막
식도
담낭
두경부
심장
신장
간
폐
림프
근육
자궁근층
신경
난소
췌장
태반
전립선
피부
소장
위
고환
흉선
갑상선
비뇨기
Wbc

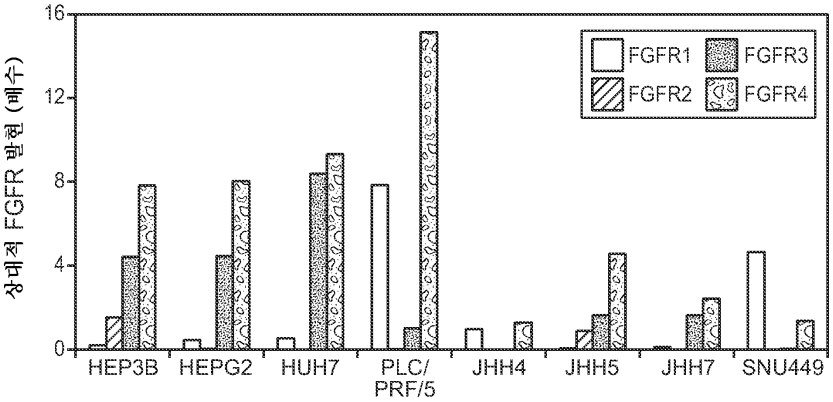
도면6b



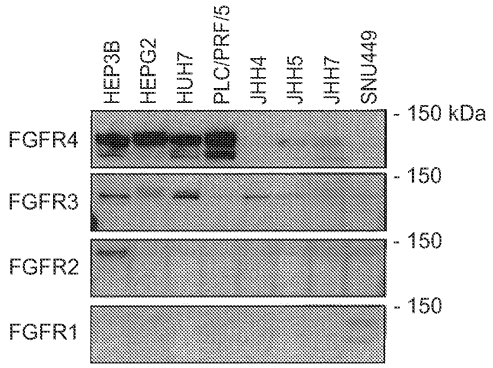
도면6c


상대적 FGFR4 발현 (배수)
0
1
2
3
4
정상
종양
N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9 N10 N11
C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 C19 C20 C21 C22 C23
조직 샘플

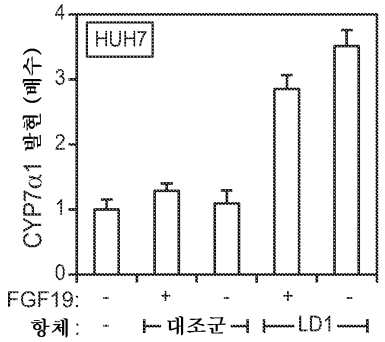
도면7a


상대적 FGFR 발현 (배수)
0
4
8
12
16
FGFR1
FGFR2
FGFR3
FGFR4
HEP3B
HEPG2
HUH7
PLC/ PRF/5
JHH4
JHH5
JHH7
SNU449

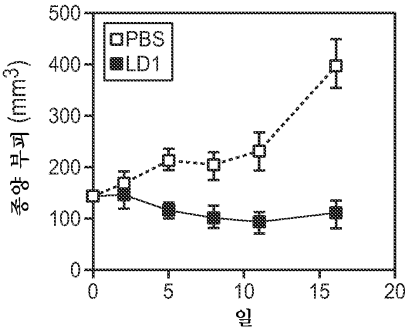
도면7b


HEP3B
HEPG2
HUH7
PLC/PRF/5
JHH4
JHH5
JHH7
SNU449
FGFR4
FGFR3
FGFR2
FGFR1
- 150 kDa
- 150
- 150
- 150

도면8


HUH7
CYP7α1 발현 (배수)
0
1
2
3
4
FGF19: - + - + -
항체: - 대조군 LD1

도면9


PBS
LD1
종양 부피 (mm3)
0
100
200
300
400
500
0
5
10
15
20
일

도면10a

카바트 - CDR L1
코티아 - CDR L1
접촉 - CDR L1

카바트#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
κ1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C																			W	Y	Q
LD1	D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q							D	I	S	F	L	N	W	Y	Q
hLD1.vB	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q							D	I	S	F	L	N	W	Y	Q
hLD1.v22	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q							D	I	S	F	L	N	W	Y	Q

카바트 - CDR L2
코티아 - CDR L2
접촉 - CDR L2

카바트#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
κ1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y								G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LD1	Q	K	P	D	G	T	F	K	I	L	I		S	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	T	L	E	Q
hLD1.vB	Q	K	P	G	K	A	F	K	I	L	I		S	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
hLD1.v22	Q	K	P	G	K	A	F	K	I	L	I		S	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

카바트 - CDR L3
코티아 - CDR L3
접촉 - CDR L3

카바트#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
κ1	E	D	F	A	T	Y	Y	C														F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(서열 33)
LD1	E	D	F	A	T	Y	F	C	Q	Q	G	N	A	L	P							Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	E	R	(서열 34)
hLD1.vB	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	A	L	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(서열 8)
hLD1.v22	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	A	L	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(서열 8)

도면10b

카바트 - CDR H1
코티아 - CDR H1
접촉 - CDR H1

카바트#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
VH3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S														W	V	R	Q	A	P
LD1	E	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	V	L	V	R	P	G	T	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	H	W	M	N			W	V	K	Q	R	P
hLD1.vB	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	N	H	W	M	N			W	V	R	Q	A	P
hLD1.v22	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	N	H	W	M	N			W	V	R	Q	A	P

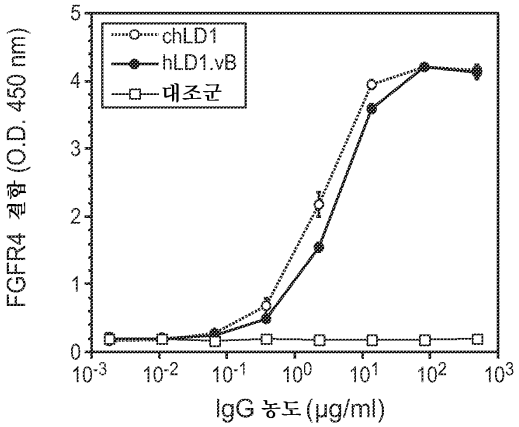
카바트 - CDR H2
코티아 - CDR H2
접촉 - CDR H2

카바트#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
VH3	G	K	G	L	E	W	V																				R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	
LD1	G	Q	G	L	E	W	I	G	M	I	H	P			S	D	S	E	T	T	L	D	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M
hLD1.vB	G	K	G	L	E	W	V	G	M	I	H	P			S	D	S	E	T	T	L	D	Q	K	F	K	D	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L
hLD1.v22	G	K	G	L	E	W	V	G	M	I	L	P			V	D	S	E	T	T	L	E	Q	K	F	K	D	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L

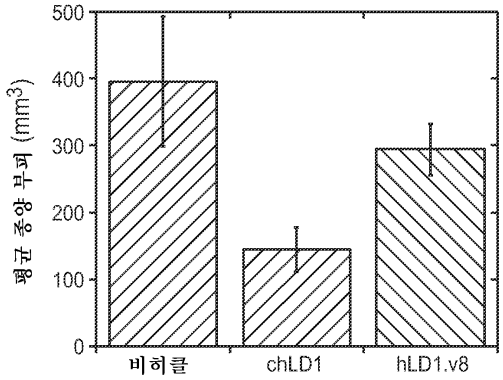
카바트 - CDR H3
코티아 - CDR H3
접촉 - CDR H3

카바트#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	(서열
VH3	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C															F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	35
LD1	Q	L	N	R	P	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	G	D	I	S	L								F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	36
hLD1.vB	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	D	I	S	L								F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	37
hLD1.v22	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	D	I	S	L								F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7)

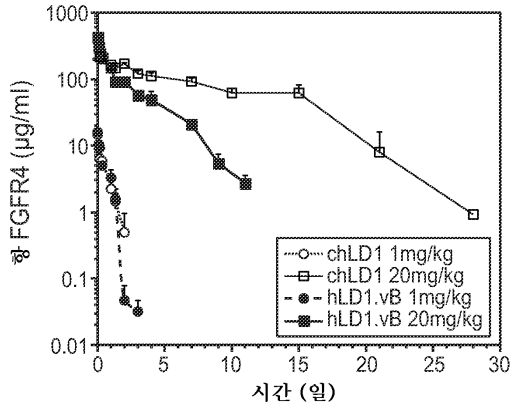
도면11a



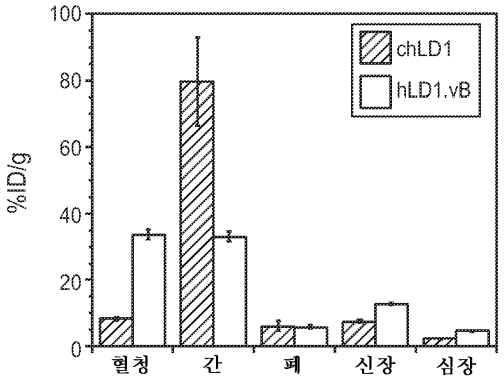
도면11b



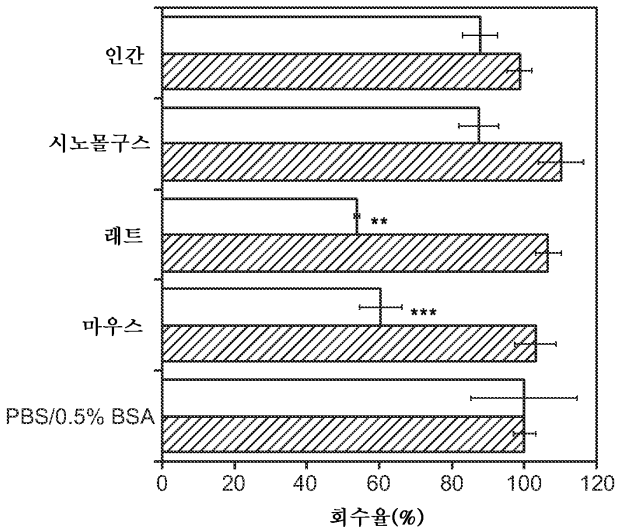
도면11c



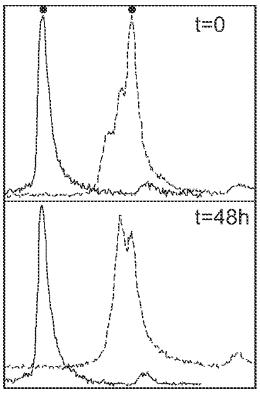
도면11d



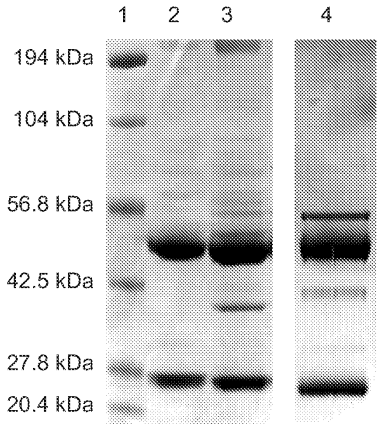
도면12a



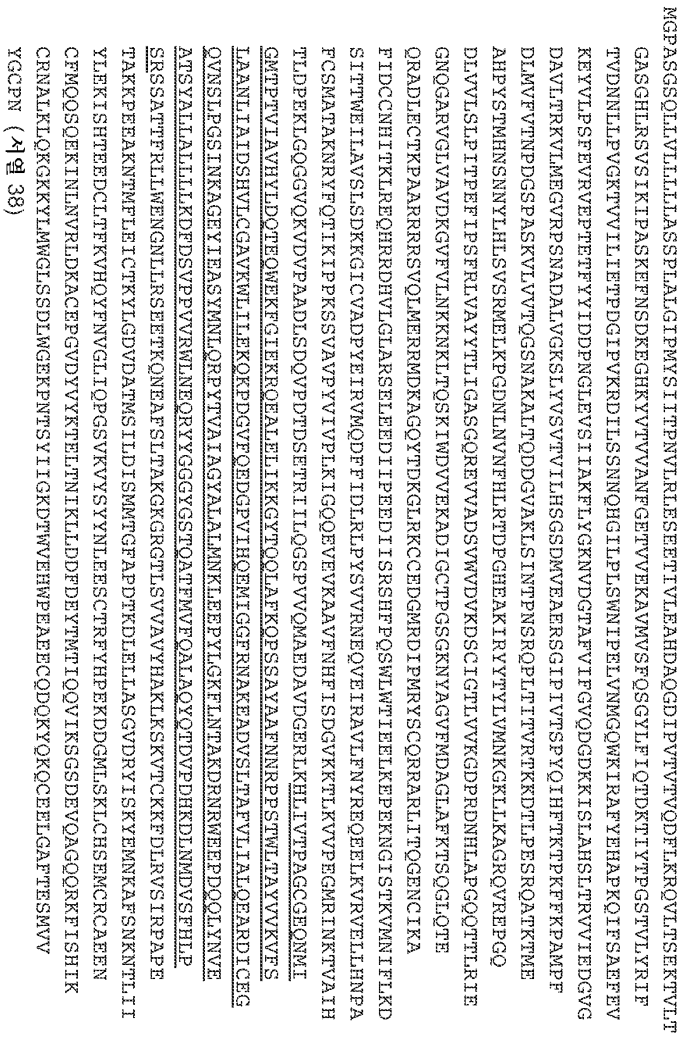
도면12b



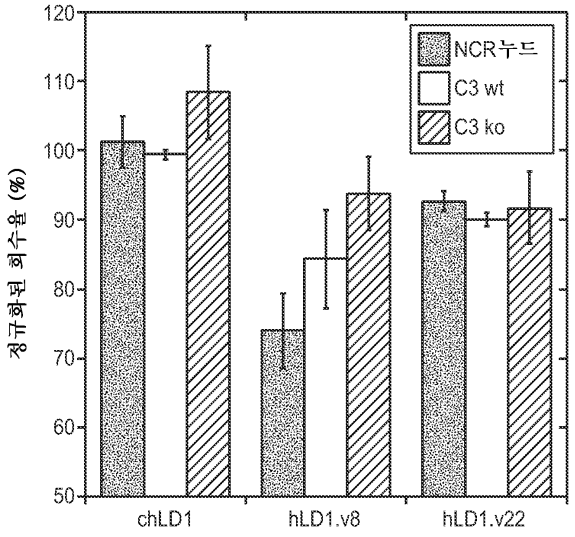
도면12c


1
2
3
4
194 kDa
104 kDa
56.8 kDa
42.5 kDa
27.8 kDa
20.4 kDa

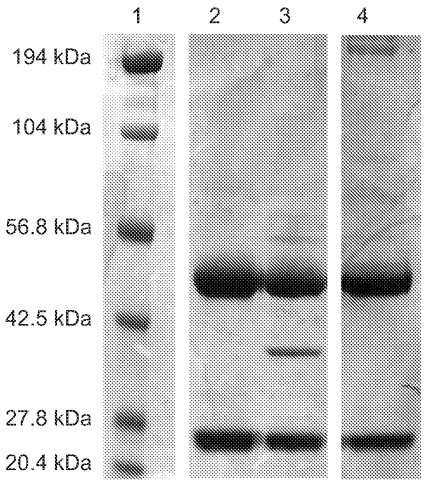
도면12d


MGPASGSQLLVLLLLLASSPLALGIPMYSIITPNVLRLESEETIVLEAHDAQGDIPVTVTVQDFLKRQVLTSEKTVLT
GASGHLRSVSIKIPASKEFNSDKEGHKYVTVVANFGETVVEKAVMVSFQSGYLFIQTDKTITYTPGSTVLYRIF
TVDNNLLPVGKTVVILIETPDGIPVKRDILSSNNQHGILPLSWNIPELVNMGQWKIRAFYEHAPKQIFSAEFEV
KEYVLPSFEVRVEPTETFYYIDDPNGLEVSIIAKFLYGKNVDGTAFVIFGVQDGDKKISLAHSLTRVVIEDGVG
DAVLTRKVLMEGVRPSNADALVGKSLYVSVTVILHSGSDMVEAERSGIPIVTSPYQIHFTKTPKFFKPAMPF
DLMVFVTNPDGSPASKVLVVTQGSNAKALTQDDGVAKLSINTPNSRQPLTITTVRTKEDTLPESRQATKTME
AHPYSTMHNSNNYLHLSVSRMELKPGDNLNVNFHLRTDPGHEAKIRYYTYLVMNKGKLLKAGRQVREPGQ
DLVVLSLPITPEFIPSFRLVAYYTLIGASGQREVVADSVWVDVKDSCIGTLVVKGDPRDNHLAPGQQTTLRIE
GNQGARVGLVAVDKGVFVLNKKNKLTQSKIWDVVEKADIGCTPGSGKNYAGVFMDAGLAFKTSQGLQTE
QRADLECTKPAARRRSVQLMERRMDKAGQYTDKGLRKCCEDGMRDIPMRYSCQRRARLITQGENCIKA
FIDCCNHITKLREQHRRDHVLGLARSELEEDIIPEEDIISRSHFPQSWLWTIEELKEPEKNGISTKVMNIFLKD
SITTWEILAVSLSDKKGICVADPYEIRVMQDFFIDLRLPYSVVRNEQVEIRAVLFNYREQEELKVRVELLHNPA
FCSMATAKNRYFQTIKIPPKSSVAVPYVIVPLKIGQQEVEVKAAVFNHFISDGVKKTLKVVPEGMRINKTVAIH
TLDPEKLGQGGVQKVDVPAADLSDQVPDTDSETRIILQGSPVVQMAEDAVDGERLKHLIVTPAGCGEQNMI
GMTPTVIAVHYLDQTEQWEKFGIEKRQEALELIKKGYTQQLAFKQPSSAYAAFNNRPPSTWLTAYVVKVFS
LAANLIAIDSHVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQEDGPVIHQEMIGGFRNAKEADVSLTAFVLIALQEARDICEG
QVNSLPGSINKAGEYIEASYMNLQRPYTVAIAGYALALMNKLEEPYLGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVE
ATSYALLALILLKDFDSVPPVVRWLNEQRYYGGGYGSTQATFMVFQALAQYQTDVPDHKDLNMDVSFHLP
SRSSATTFRLLWENGNLLRSEETKQNEAFSLTAKGKGRGTLSVVAVYHAKLKSKVTCKKFDLRVSIRPAPE
TAKKPEEAKNTMFLEICTKYLGDVDATMSILDISMMTGFAPDTKDLELLASGVDRYISKYEMNKAFSNKNTLII
YLEKISHTEEDCLTFKVHQYFNVGLIQPGSVKVYSYYNLEESCTRFYHPEKDDGMLSKLCHSEMCRCAEEN
CFMQQSQEKINLNVRLDKACEPGVDYVYKTELTNIKLLDDFDEYTMTIQQVIKSGSDEVQAGQQRKFISHIK
CRNALKLQKGKKYLMWGLSSDLWGEKPNTSYIIGKDTWVEHHWPEAEECQDQKYQKQCEELGAFTESMVV
YGCPN (서열 38)

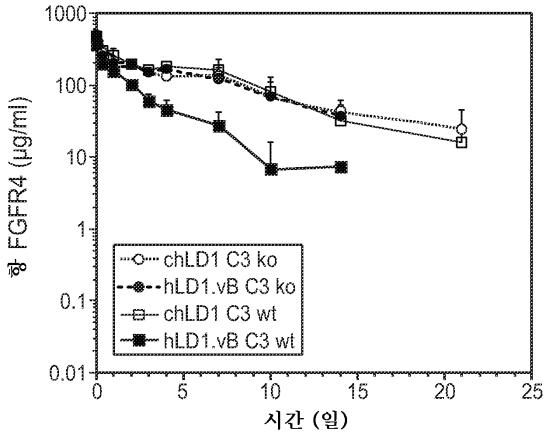
도면13a



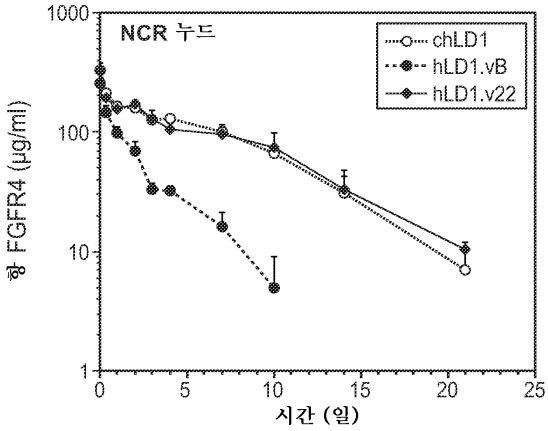
도면13b



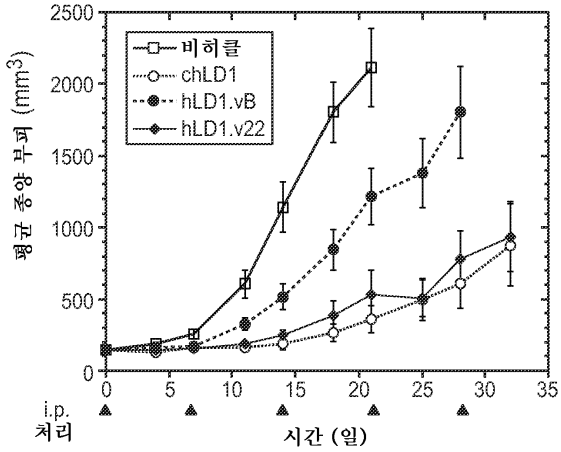
도면14a



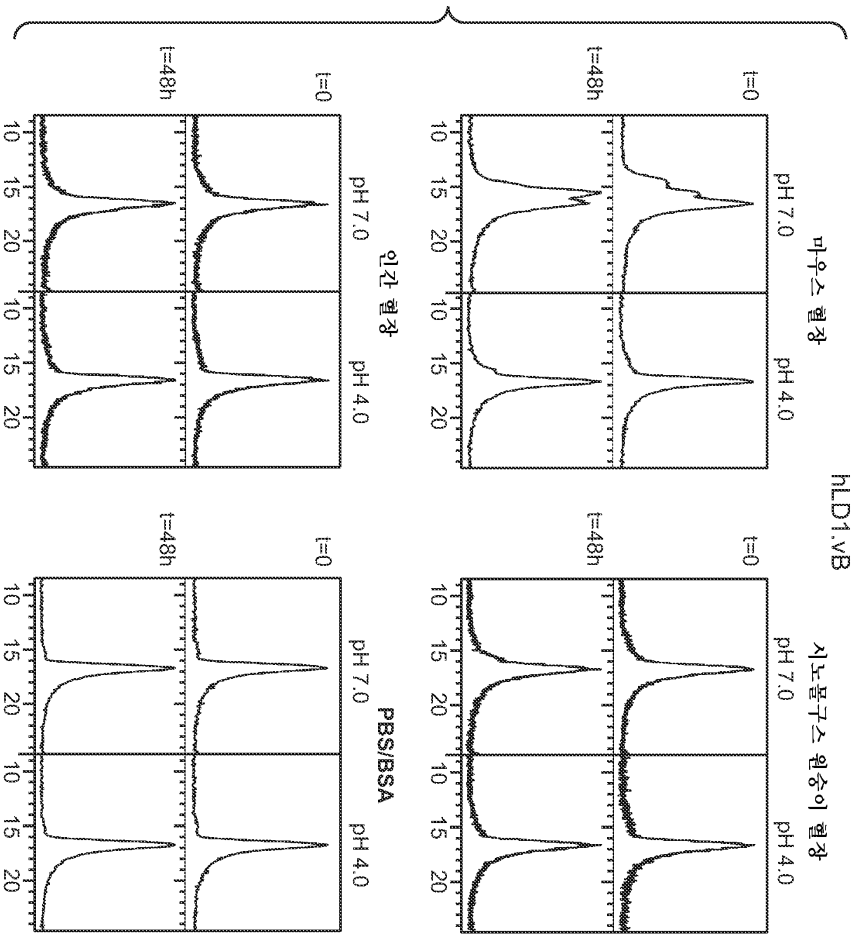
도면14b


NCR 누드
chLD1
hLD1.vB
hLD1.v22
항 FGFR4 (μg/ml)
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
시간 (일)

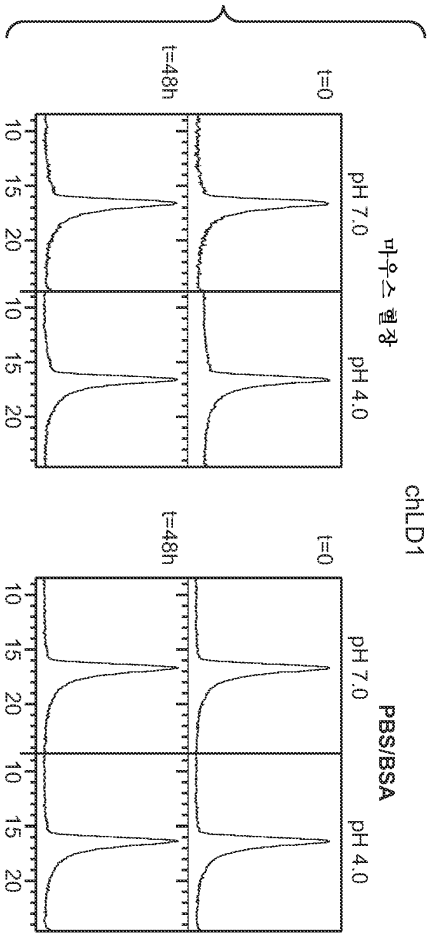
도면14c


비히클
chLD1
hLD1.vB
hLD1.v22
평균 종양 부피 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
i.p.
처리
시간 (일)

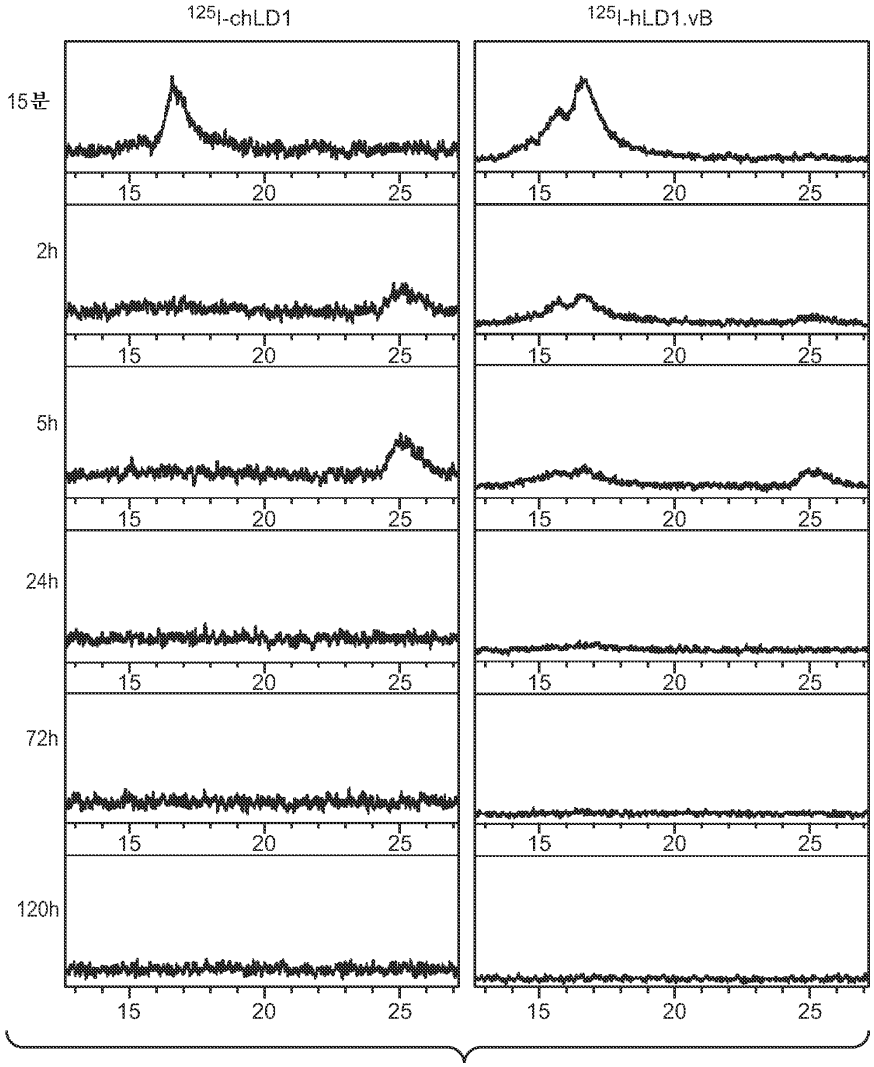
도면15a


hLD1.vB
마우스 혈장
시노몰구스 원숭이 혈장
인간 혈장
PBS/BSA
pH 7.0
pH 4.0
t=0
t=48h
10
15
20

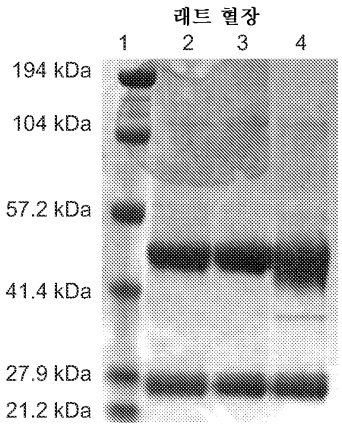
도면15b



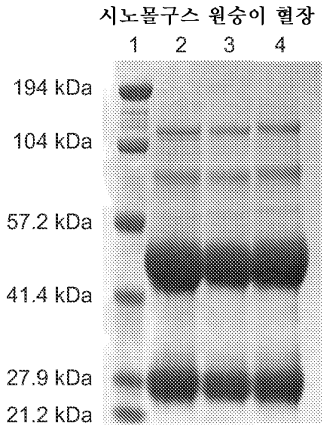
도면15c


125I-chLD1
125I-hLD1.vB
15분
2h
5h
24h
72h
120h
15
20
25

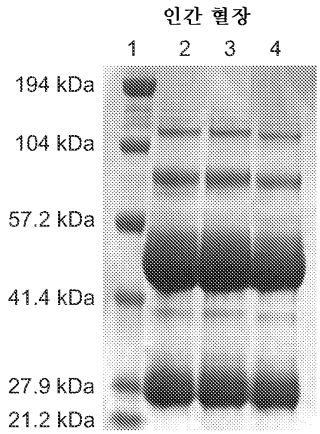
도면16a


래트 혈장
1
2
3
4
194 kDa
104 kDa
57.2 kDa
41.4 kDa
27.9 kDa
21.2 kDa

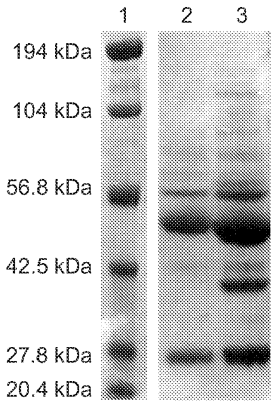
도면16b



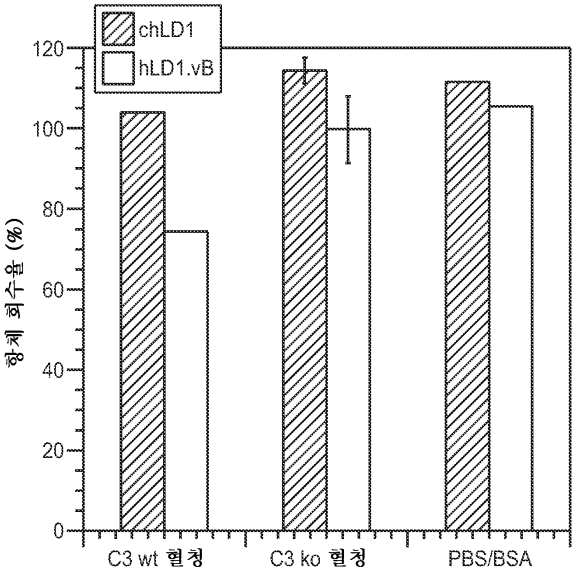
도면16c



도면16d



도면17



도면18

MRLLLALLGVLLSVPGPPVLSLEASEEVELEPCLAPSLEQQEQELTVA
LGQPVRLCCGRAERGGHWYKEGSRLAPAGRVRGWRGRLEIASFLP
EDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSLTSSNDDEDPKSHRDPSNRH
SYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLK
DGQAFHGENRIGGIRLRHQHWSLVMESVVPSDRGTYTCLVENAVGSI
RYNYLLDVLERSPHRPILQAGLPANTTAVVGSDVELLCKVYSDAQPHI
QWLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKTADINSSEVEVLYLRNVSAEDAG
EYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPTWTAAAPEARYTDIILYASGS
LALAVLLLLAGLYRGQALHGRHPRPPATVQKLSRFPLARQFSLESGS
SGKSSSSLVRGVRLSSSGPALLAGLVSLDLPLDPLWEFPRDRLVLGK
PLGEGCFGQVVRAEAFGMDPARPDQASTVAVKMLKDNASDKDLADL
VSEMEVMKLIGRHKNIINLLGVCTQEGPLYVIVECAAKGNLREFLRAR
RPPGPDLSPDGPRSSEGPLSFPVLVSCAYQVARGMQYLESRKCIHR
DLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARGVHHIDYYKKTSNGRLPVKWMAP
EALFDRVYTHQSDVWSFGILLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFSLLREGH
RMDRPPHCPPELYGLMRECWHAAPSQRPTFKQLVEALDKVLLAVSE
EYLDLRLTFGPYSPSGGDASSTCSSSDSVFSHDPLPLGSSSFPFGSG
VQTEFT (서열 39)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> ANTI-FGFR4 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

<130> P4524R1 WO

<140><141><150> 61/473,106

<151> 2011-04-07

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 1

Asn His Trp Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 2

Met Ile Leu Pro Val Asp Ser Glu Thr Thr Leu Glu Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 3

Gly Asp Ile Ser Leu Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 4

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Asp Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 8

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 Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Gly Asn Ala Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

20

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 12

<

211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 14

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 39

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 17

Asp Val Pro Ala Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ala Val Asp Gly Glu Arg

35

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 18

Arg Gln Glu Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu

1 5 10 15

Ala Phe Lys

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

Ala Ala Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val

1 5 10 15

Val Lys

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

Ala Ala Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser His Val Leu Cys Gly Ala Val

1 5 10 15

Lys

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Gly Pro Val Ile His Gln

1 5 10 15

Glu Met Ile Gly Gly Phe Arg

20

<210> 22

<211> 64

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 22

Glu Ala Asp Val Ser Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu Gln Glu

1 5 10 15

Ala Arg Asp Ile Cys Glu Gly Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile

20 25 30

Asn Lys Ala Gly Glu Tyr Ile Glu Ala Ser Tyr Met Asn Leu Gln Arg

35 40 45

Pro Tyr Thr Val Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys

50 55 60

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 23

Trp Glu Glu Pro Asp Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr

1 5 10 15

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 24

Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala Thr Phe Met Val Phe

1 5 10 15

Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Thr Asp Val Pro Asp His Lys

20 25 30

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 25

Gly Thr Leu Ser Val Val Ala Val Tyr His Ala Lys

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 26

Asp Leu Glu Leu Leu Ala Ser Gly Val Asp Arg

1 5 10

<210> 27

<211

> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 27

Asn Thr Leu Ile Ile Tyr Leu Glu Lys

1 5

<210> 28

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 28

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

20

<210> 29

<211> 15

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 29

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 30

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 30

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 31

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 32

Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Lys Met Lys Ser

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

Arg

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 34

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Phe Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Ser Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Glu Arg

100 105

<210> 35

<211> 82

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

65 70 75 80

Ser Ser

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 36

Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Val Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Thr Leu Asp Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Arg Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Gly Asp Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Thr Leu Asp Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Asp Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 1663

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 38

Met Gly Pro Ala Ser Gly Ser Gln Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Ser Ser Pro Leu Ala Leu Gly Ile Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr

20 25 30

Pro Asn Val Leu Arg Leu Glu Ser Glu Glu Thr Ile Val Leu Glu Ala

35 40 45

His Asp Ala Gln Gly Asp Ile Pro Val Thr Val Thr Val Gln Asp Phe

50 55 60

Leu Lys Arg Gln Val Leu Thr Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Gly Ala

65 70 75 80

Ser Gly His Leu Arg Ser Val Ser Ile Lys Ile Pro Ala Ser Lys Glu

85 90 95

Phe Asn Ser Asp Lys Glu Gly His Lys Tyr Val Thr Val Val Ala Asn

100 105 110

Phe Gly Glu Thr Val Val Glu Lys Ala Val Met Val Ser Phe Gln Ser

115 120 125

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

130 135 140

Thr Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr Val Asp Asn Asn Leu Leu Pro Val

145 150 155 160

Gly Lys Thr Val Val Ile Leu Ile Glu Thr Pro Asp Gly Ile Pro Val
165 170 175
Lys Arg Asp Ile Leu Ser Ser Asn Asn Gln His Gly Ile Leu Pro Leu
180 185 190
Ser Trp Asn Ile Pro Glu Leu Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg

195 200 205
Ala Phe Tyr Glu His Ala Pro Lys Gln Ile Phe Ser Ala Glu Phe Glu
210 215 220
Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser Phe Glu Val Arg Val Glu Pro Thr
225 230 235 240
Glu Thr Phe Tyr Tyr Ile Asp Asp Pro Asn Gly Leu Glu Val Ser Ile
245 250 255
Ile Ala Lys Phe Leu Tyr Gly Lys Asn Val Asp Gly Thr Ala Phe Val

260 265 270
Ile Phe Gly Val Gln Asp Gly Asp Lys Lys Ile Ser Leu Ala His Ser
275 280 285
Leu Thr Arg Val Val Ile Glu Asp Gly Val Gly Asp Ala Val Leu Thr
290 295 300
Arg Lys Val Leu Met Glu Gly Val Arg Pro Ser Asn Ala Asp Ala Leu
305 310 315 320
Val Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser Val Thr Val Ile Leu His Ser Gly

325 330 335
Ser Asp Met Val Glu Ala Glu Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser
340 345 350
Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys Phe Phe Lys Pro Ala
355 360 365
Met Pro Phe Asp Leu Met Val Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro
370 375 380
Ala Ser Lys Val Leu Val Val Thr Gln Gly Ser Asn Ala Lys Ala Leu

385 390 395 400
Thr Gln Asp Asp Gly Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr Pro Asn Ser

405 410 415

Arg Gln Pro Leu Thr Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Asp Thr Leu Pro

420 425 430

Glu Ser Arg Gln Ala Thr Lys Thr Met Glu Ala His Pro Tyr Ser Thr

435 440 445

Met His Asn Ser Asn Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Ser Arg Met Glu

450 455 460

Leu Lys Pro Gly Asp Asn Leu Asn Val Asn Phe His Leu Arg Thr Asp

465 470 475 480

Pro Gly His Glu Ala Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Val Met Asn

485 490 495

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

500 505 510

Asp Leu Val Val Leu Ser Leu Pro Ile Thr Pro Glu Phe Ile Pro Ser

515 520 525

Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg

530 535 540

Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Ile

545 550 555 560

Gly Thr Leu Val Val Lys Gly Asp Pro Arg Asp Asn His Leu Ala Pro

565 570 575

Gly Gln Gln Thr Thr Leu Arg Ile Glu Gly Asn Gln Gly Ala Arg Val

580 585 590

Gly Leu Val Ala Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys Asn

595 600 605

Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp Ile

610 615 620

Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys Asn Tyr Ala Gly Val Phe Met Asp

625 630 635 640

Ala Gly Leu Ala Phe Lys Thr Ser Gln Gly Leu Gln Thr Glu Gln Arg

645 650 655

Ala Asp Leu Glu Cys Thr Lys Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Val
660 665 670
Gln Leu Met Glu Arg Arg Met Asp Lys Ala Gly Gln Tyr Thr Asp Lys
675 680 685
Gly Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Asp Ile Pro Met Arg
690 695 700
Tyr Ser Cys Gln Arg Arg Ala Arg Leu Ile Thr Gln Gly Glu Asn Cys

705 710 715 720
Ile Lys Ala Phe Ile Asp Cys Cys Asn His Ile Thr Lys Leu Arg Glu
725 730 735
Gln His Arg Arg Asp His Val Leu Gly Leu Ala Arg Ser Glu Leu Glu
740 745 750
Glu Asp Ile Ile Pro Glu Glu Asp Ile Ile Ser Arg Ser His Phe Pro
755 760 765
Gln Ser Trp Leu Trp Thr Ile Glu Glu Leu Lys Glu Pro Glu Lys Asn

770 775 780
Gly Ile Ser Thr Lys Val Met Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr
785 790 795 800
Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser Leu Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys
805 810 815
Val Ala Asp Pro Tyr Glu Ile Arg Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp
820 825 830
Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg

835 840 845
Ala Val Leu Phe Asn Tyr Arg Glu Gln Glu Glu Leu Lys Val Arg Val
850 855 860
Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe Cys Ser Met Ala Thr Ala Lys Asn
865 870 875 880
Arg Tyr Phe Gln Thr Ile Lys Ile Pro Pro Lys Ser Ser Val Ala Val
885 890 895
Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys Ile Gly Gln Gln Glu Val Glu Val

900 905 910

Lys Ala Ala Val Phe Asn His Phe Ile Ser Asp Gly Val Lys Lys Thr

915 920 925

Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Met Arg Ile Asn Lys Thr Val Ala Ile

930 935 940

His Thr Leu Asp Pro Glu Lys Leu Gly Gln Gly Gly Val Gln Lys Val

945 950 955 960

Asp Val Pro Ala Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Asp Ser

965 970 975

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

980 985 990

Asp Ala Val Asp Gly Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ala

995 1000 1005

Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile

1010 1015 1020

Ala Val His Tyr Leu Asp Gln Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly

1025 1030 1035

Ile Glu Lys Arg Gln Glu Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr

1040 1045 1050

Thr Gln Gln Leu Ala Phe Lys Gln Pro Ser Ser Ala Tyr Ala Ala

1055 1060 1065

Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val

1070 1075 1080

Lys Val Phe Ser Leu Ala Ala Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser His

1085 1090 1095

Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Lys

1100 1105 1110

Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Gly Pro Val Ile His Gln Glu

1115 1120 1125

Met Ile Gly Gly Phe Arg Asn Ala Lys Glu Ala Asp Val Ser Leu

1130 1135 1140

Thr Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu Gln Glu Ala Arg Asp Ile Cys

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

Glu Tyr Ile Glu Ala Ser Tyr Met Asn Leu Gln Arg Pro Tyr Thr

1175 1180 1185

Val Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys Leu Glu

1190 1195 1200

Glu Pro Tyr Leu Gly Lys Phe Leu Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn

1205 1210 1215

Arg Trp Glu Glu Pro Asp Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr

1220 1225 1230

Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp Ser

1235 1240 1245

Val Pro Pro Val Val Arg Trp Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly

1250 1255 1260

Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala

1265 1270 1275

Leu Ala Gln Tyr Gln Thr Asp Val Pro Asp His Lys Asp Leu Asn

1280 1285 1290

Met Asp Val Ser Phe His Leu Pro Ser Arg Ser Ser Ala Thr Thr

1295 1300 1305

Phe Arg Leu Leu Trp Glu Asn Gly Asn Leu Leu Arg Ser Glu Glu

1310 1315 1320

Thr Lys Gln Asn Glu Ala Phe Ser Leu Thr Ala Lys Gly Lys Gly

1325 1330 1335

Arg Gly Thr Leu Ser Val Val Ala Val Tyr His Ala Lys Leu Lys

1340 1345 1350

Ser Lys Val Thr Cys Lys Lys Phe Asp Leu Arg Val Ser Ile Arg

1355 1360 1365

Pro Ala Pro Glu Thr Ala Lys Lys Pro Glu Glu Ala Lys Asn Thr

1370 1375 1380

Met Phe Leu Glu Ile Cys Thr Lys Tyr Leu Gly Asp Val Asp Ala

1385 1390 1395

Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro

1400 1405 1410

Asp Thr Lys Asp Leu Glu Leu Leu Ala Ser Gly Val Asp Arg Tyr

1415 1420 1425

Ile Ser Lys Tyr Glu Met Asn Lys Ala Phe Ser Asn Lys Asn Thr

1430 1435 1440

Leu Ile Ile Tyr Leu Glu Lys Ile Ser His Thr Glu Glu Asp Cys

1445 1450 1455

Leu Thr Phe Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Gly Leu Ile Gln

1460 1465 1470

Pro Gly Ser Val Lys Val Tyr Ser Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser

1475 1480 1485

Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu Lys Asp Asp Gly Met Leu Ser

1490 1495 1500

Lys Leu Cys His Ser Glu Met Cys Arg Cys Ala Glu Glu Asn Cys

1505 1510 1515

Phe Met Gln Gln Ser Gln Glu Lys Ile Asn Leu Asn Val Arg Leu

1520 1525 1530

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

1535 1540 1545

Leu Thr Asn Ile Lys Leu Leu Asp Asp Phe Asp Glu Tyr Thr Met

1550 1555 1560

Thr Ile Gln Gln Val Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val Gln Ala

1565 1570 1575

Gly Gln Gln Arg Lys Phe Ile Ser His Ile Lys Cys Arg Asn Ala

1580 1585 1590

Leu Lys Leu Gln Lys Gly Lys Lys Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser

1595 1600 1605

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

1610 1615 1620

Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Ala Glu Glu Cys Gln

1625 1630 1635

Asp Gln Lys Tyr Gln Lys Gln Cys Glu Glu Leu Gly Ala Phe Thr

1640 1645 1650

Glu Ser Met Val Val Tyr Gly Cys Pro Asn

1655 1660

<210> 39

<211> 805

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly

1 5 10 15

Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro

20 25 30

Cys Leu Ala Pro Ser Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala

35 40 45

Leu Gly Gln Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly

50 55 60

His Trp Tyr Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg

65 70 75 80

Gly Trp Arg Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala

85 90 95

Gly Arg Tyr Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn

100 105 110

Leu Thr Leu Ile Thr Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu

115 120 125

Asp Pro Lys Ser His Arg Asp Pro Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln

130 135 140

Gln Ala Pro Tyr Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His

145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly

165 170 175

Asn Pro Thr Pro Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His

180 185 190

Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser

195 200 205

Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys

210 215 220

Leu Val Glu Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp

225 230 235 240

Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro

245 250 255

Ala Asn Thr Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys

260 265 270

Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val

275 280 285

Ile Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val

290 295 300

Leu Lys Thr Ala Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu

305 310 315 320

Arg Asn Val Ser Ala Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly

325 330 335

Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro

340 345 350

Glu Glu Asp Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Arg Tyr Thr

355 360 365

Asp Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu

370 375 380

Leu Leu Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Gln Ala Leu His Gly Arg His Pro

385 390 395 400

Arg Pro Pro Ala Thr Val Gln Lys Leu Ser Arg Phe Pro Leu Ala Arg

405 410 415

Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Leu

420 425 430

Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly

435 440 445

Leu Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg

450 455 460

Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln

465 470 475 480

Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly Met Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln

485 490 495

Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys

500 505 510

Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly

515 520 525

Arg His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly

530 535 540

Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Cys Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu

545 550 555 560

Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly

565 570 575

Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Val Leu Val Ser Cys

580 585 590

Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys

595 600 605

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn

610 615 620

Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile

625 630 635 640

Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met

645 650 655

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

660 665 670

Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser

675 680 685

Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu

690 695 700

Gly His Arg Met Asp Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly

705 710 715 720

Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe

725 730 735

Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu

740 745 750

Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly

755 760 765

Gly Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His

770 775 780

Asp Pro Leu Pro Leu Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val

785 790 795 800

Gln Thr Glu Phe Thr

805