



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월31일

(11) 등록번호 10-2516152

(24) 등록일자 2023년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2863 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7005003

(22) 출원일자(국제) 2014년07월31일

심사청구일자 2019년07월26일

(85) 번역문제출일자 2016년02월25일

(65) 공개번호 10-2016-0030578

(43) 공개일자 2016년03월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/049008

(87) 국제공개번호 WO 2015/017600

국제공개일자 2015년02월05일

(30) 우선권주장

61/861,198 2013년08월01일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US08101723 B2*

WO2010054265 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

파이프 프라임 테라퓨틱스, 인크.

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오
이스터 포인트 불러바드 111

(72) 발명자

하딩, 토머스

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
투 코포레이트 드라이브

피어스, 크리스틴

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
투 코포레이트 드라이브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 52 항

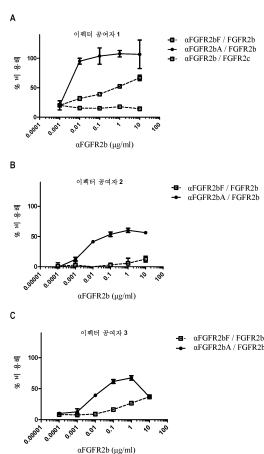
심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체

(57) 요약

본 발명은 FGFR2IIIb에 결합하며, 비푸코실화된 것인 항체를 제공한다. 본 발명은 FGFR2IIIb에 결합하는 항체를 포함하며, 조성물 중의 항체의 적어도 95%가 비푸코실화된 것인 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/901,732 2013년11월08일 미국(US)
61/933,632 2014년01월30일 미국(US)

(72) 발명자

파틸, 남라타

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 투
코포레이트 드라이브

브레넨, 토머스

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 투
코포레이트 드라이브

햄블턴, 줄리

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 투
코포레이트 드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

항-FGFR2IIIb 항체를 포함하며, 각각의 항-FGFR2IIIb 항체가 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이

- (i) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (ii) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및
 - (iii) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고;
- 경쇄 가변 영역이
- (iv) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (v) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (vi) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고;

조성물 중의 항-FGFR2IIIb 항체의 적어도 95%가 비푸코실화된 것인, 개체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 경쇄 가변 영역이 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 4의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 중쇄가 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 경쇄가 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 중쇄가 서열 2의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄가 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 키메라 항체인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 Asn297에서 푸코스가 결핍된 것인 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 푸코스가 조성물에서 검출불가능한 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 κ 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 항체가 위치 Asn297에서 푸코스가 결핍된 것인 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 비푸코실화된 항체가 동일한 아미노산 서열을 갖는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 시험관내에서 향상된 ADCC 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체로의 비 용해(specific lysis)보다 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70 또는 적어도 75 퍼센트 포인트 더 큰 비 용해를 유발하는 것인 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, ADCC 활성이 표적 세포로서 FGFR2IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포 및 이펙터 세포로서 단리된 인간 PBMC를 사용하여 측정되는 것인 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 비푸코실화된 항체가 동일한 아미노산 서열을 갖는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는 것인 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체보다 적어도 2-배, 적어도 3-배, 적어도 4-배, 적어도 5-배, 적어도 7-배, 적어도 10-배, 적어도 12-배, 적어도 15-배, 적어도 17-배 또는 적어도 20-배 더 큰 친화도로 Fc 감마 RIIIA에 결합하는 것인 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도가 표면 플라스몬 공명을 사용하여 측정되는 것인 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, Fc 감마 RIIIA가 Fc 감마 RIIIA(V158) 및 Fc 감마 RIIIA(F158)로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, Fc 감마 RIIIA가 Fc 감마 RIIIA(V158)인 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 FGFR2IIIb에 결합하지만, FGFR2IIIc에는 결합하지 않는 것인 조성물.

청구항 25

기능적 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자 (FUT8) 유전자가 결핍된, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항-FGFR2IIIb 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 27

제25항의 숙주 세포를 항-FGFR2IIIb 항체를 코딩하는 핵산을 발현하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 제조 방법.

청구항 28

제25항의 숙주 세포를 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 생성하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 제조 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체를 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체의 적어도 95%가 비푸코실화된 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 푸코스가 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체에서 검출불가능한 것인 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 푸코스가 HPLC, 모세관 전기영동 또는 MALDI-TOF 질량 분광법을 포함하는 방법에 의해 검출되는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 개체에서 암을 치료하기 위한 조성물이며, 여기서 암은 고형 종양을 포함하고 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는 것인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 암이 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 및 식도암으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 암이 위암인 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 FGFR2IIIb를 발현하는 것인 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 암이 FGFR2IIIb를 과발현하는 것인 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 암이 위암인 조성물.

청구항 39

제37항에 있어서, FGFR2IIIb 발현이 면역조직화학 (IHC)에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 40

제37항에 있어서, 암이 FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 41

제37항에 있어서, 암이 FGFR2 유전자 증폭을 포함하는 것인 조성물.

청구항 42

제33항에 있어서, 치료가 백금 제제, 파클리탁셀, 아브락산 (ABRAXANE)®, 도세탁셀, 겐시타빈, 카페시타빈, 이리노테칸, 에피루비신, 폴폭스 (FOLFOX), 폴피리 (FOLFIRI), 류코보린, 플루오로우라실, 미토마이신 C 및 독소루비신 히드로클로라이드로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 추가의 치료제가 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴으로부터 선택되는 백금 제제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 44

제42항에 있어서, 추가의 치료제가 파클리탁셀을 포함하는 것인 조성물.

청구항 45

제42항에 있어서, 추가의 치료제가 시스플라틴 및/또는 5-FU를 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

제42항에 있어서, 추가의 치료제가 폴폭스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 중쇄 가변 영역이

- (i) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (ii) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및
- (iii) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고;

경쇄 가변 영역이

- (iv) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (v) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (vi) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 것인, 개체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체.

청구항 48

제47항에 있어서, 중쇄 가변 도메인이 서열 4의 아미노산 서열을 포함하고 경쇄 가변 도메인이 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 49

제47항에 있어서, 중쇄가 서열 2의 아미노산 서열을 포함하고 경쇄가 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, Asn297에서 푸코스가 결핍된 것인 항체.

청구항 51

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 FGFR2IIIb를 발현하는 것인 항체.

청구항 52

제51항에 있어서, 암이 FGFR2IIIb를 과발현하는 것인 항체.

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다.

배경 기술

[0002] 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 과 구성원은 4가지 공지된 티로신 키나제 수용체인 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 내지 4 (FGFR1 내지 4) 및 그의 이소형에 결합하며, 다양한 FGF는 상이한 FGFR과 다양한 정도로 결합한다 (Zhang et al., J. Biol. Chem. 281:15694, 2006). 인간 FGFR2의 단백질 서열은 예를 들어 진뱅크 로커스 (GenBank Locus) AF487553에서 제공된다. 각각의 FGFR은 단일 막관통 나선인 3가지 이뮤노글로불린 (Ig)-유사 도메인 (D1, D2 및 D3)을 포함하는 세포외 도메인 (ECD), 및 세포내 촉매적 키나제 도메인으로 이루어진다 (Mohammadi et al., Cytokine Growth Factor Revs, 16:107, 2005). "엑시드 박스" (AB)로 지칭되는 D1과 D2 사이의 링커에는 산성 아미노산의 인접한 스트레치가 있다. D1 및 AB를 함유하는 영역은 리간드에 결합함으로써 제거되는 수용체의 자가억제에 관련되는 것으로 믿어진다. FGF는 주로 수용체의 D2 및 D3의 영역을 통해 수용체에 결합한다. FGFR은 다양한 이소형을 초래하는 그의 mRNA의 다중 선택적 스플라이싱을 특징으로 한다 (Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271:15292, 1996; 또한 FGFR2 및 그의 이소형의 서열에 대해 스위스-프롯 (Swiss-Prot) P21802 및 이소형 P21802-1 내지 -20 참조). 특히, 모든 3가지 Ig 도메인을 함유하는 형태 (α 이소형) 또는 D1 없이 2가지 Ig 도메인 D2 및 D3 도메인만을 함유하는 형태 (β 이소형)가 있다. FGFR1 내지 FGFR3에서, 모든 형태는 IIIa로 나타낸 D3의 첫번째 절반을 함유하지만, 2가지 대안적 엑손은 IIIb 및 IIIc 형태를 초래하는 D3의 두번째 절반에 대해 이용될 수 있다. FGFR2에 대해, 이들은 각각 FGFR2IIIb 및 FGFR2IIIc (또는 단지 FGFR2b 및 FGFR2c)로 나타내어지며; 상응하는 베타 형태는 FGFR2(베타)IIIb 및 FGFR2(베타)IIIc로

나타내어진다. FGFR2의 FGFR2IIIb 형태 (또한 K-sam-II로도 나타내어짐)는 FGF1 및 KGF 과 구성원 (FGF7, FGF10 및 FGF22) 둘 다에 대한 고 친화도 수용체인 반면, FGFR2IIc (또한 K-sam-I로도 나타내어짐)는 FGF1 및 FGF2 둘 다에 잘 결합하지만, KGF 과 구성원에는 결합하지 않는다 (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:246, 1992). 사실, FGFR2IIIb는 KGF 과 구성원에 대한 유일한 수용체이며 (Ornitz et al., 1996, 상기 문헌), 따라서 또한 KGFR로 표시된다.

[0003] FGFR 및 그의 이소형은 다양한 조직에서 차등적으로 발현된다. FGFR2IIIb (및 FGFR1 및 FGFR3의 IIIb 형태)는 상피 조직에서 발현되는 반면, FGFRIIc는 간엽 조직에서 발현된다 (Duan et al., J. Biol. Chem. 267:16076, 1992; Ornitz et al., 1996, 상기 문헌). 이들 수용체의 특정 FGF 리간드는 반대의 발현 패턴을 갖는다. 즉, FGF7 (KGF), FGF10 및 FGF22를 비롯한 KGF 하위과 구성원은 FGFRIIb에만 결합하며 (Zhang et al., 상기 문헌), 간엽 조직에서 발현되어, 상피 세포의 측분비 이펙터일 수 있다 (Ornitz et al., 1996, 상기 문헌). 반면, FGF4 하위과 구성원 FGF4 내지 6은 FGFR2IIc에 결합하며, 상피 및 간엽 계통 둘 다에서 발현되어, 자가 분비 또는 측분비 기능을 가질 수 있다. FGFR2 및 그의 리간드의 이소형의 발현 패턴 때문에, FGFR2는 상피-간엽 상호작용에 역할을 하므로 (Finch et al., Dev. Dyn. 203:223, 1995), 마우스에서의 FGFR2IIIb의 넵-아웃이 심각한 배아 결함 및 치사를 초래한다는 것은 놀랍지 않다 (De Moerloose et al., Development 127:483, 2000).

[0004] KGF (FGF7) 및 KGFR (FGFR2IIIb)은 많은 체장암에서 과발현되며 (Ishiwata et al., Am. J. Pathol. 153: 213, 1998), 이들의 공동발현은 좋지 않은 예후와 상관관계가 있다 (Cho et al., Am. J. Pathol. 170:1964, 2007). FGFR2 유전자의 체세포 돌연변이는 자궁내막 (자궁) 암종의 큰 패널의 12%에서 발견되었으며, 몇몇 시험된 경우 중앙 세포 생존에 대해 요구되었다 (Dutt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8713, 2008). 2가지 중앙에서, FGFR2 돌연변이는 아페르 증후군과 관련된 동일한 S252W 치환인 것으로 밝혀졌다. FGFR2의 증폭 및 과발현은 특히 좋지 않은 예후를 갖는 위암의 비분화된 확산 유형과 관련되며, 소분자 화합물에 의한 FGFR2 활성의 억제는 이러한 암 세포의 증식을 강력하게 억제하였다 (Kunii et al., Cancer Res. 68:2340, 2008; Nakamura et al., Gastroenterol. 131:1530, 2006).

발명의 내용

[0005] 발명의 요약

[0006] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역이 (i) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고; 경쇄 가변 영역이 (iv) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (v) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (vi) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고; 항체가 비푸코실화된 것인 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 Asn297에서 푸코스가 결핍되어 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하며, 조성물 중의 각각의 항-FGFR2IIIb 항체의 중쇄 가변 영역이 (i) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고; 조성물 중의 각각의 항-FGFR2IIIb 항체의 경쇄 가변 영역이 (iv) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (v) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (vi) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고; 조성물 중의 항체의 적어도 95%가 비푸코실화된 것인 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항체-생성 세포주로부터의 상청액일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 완충된 조성물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 4의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인은 서열 5의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 4의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열 5의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열 3의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열 2의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 3의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하며, 항체가 FGFR2IIIb에의 결합에 대해 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체와 경쟁하는 것인 조성물이 제공된다.

[0007] 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 항체는 κ 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 항체는 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0008] 일부 실시양태에서, 항체는 동일한 서열을 갖는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 시험관내에서 향상된

ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체로의 비 용해(specific lysis)보다 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70 또는 적어도 75 퍼센트 포인트 더 큰 비 용해를 유발한다. 일부 실시양태에서, ADCC 활성은 표적 세포로서 FGFR2IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포 및 이펙터 세포로서 단리된 인간 PBMC를 사용하여 측정된다.

[0009] 일부 실시양태에서, 항체는 동일한 아미노산 서열을 갖는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체보다 적어도 2-배, 적어도 3-배, 적어도 4-배, 적어도 5-배, 적어도 7-배, 적어도 10-배, 적어도 12-배, 적어도 15-배, 적어도 17-배 또는 적어도 20-배 더 큰 친화도로 Fc 감마 RIIIA에 결합한다. 일부 실시양태에서, Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도는 표면 플라스몬 공명을 사용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, Fc 감마 RIIIA는 Fc 감마 RIIIA(V158) 및 Fc 감마 RIIIA(F158)로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, Fc 감마 RIIIA는 Fc 감마 RIIIA(V158)이다.

[0010] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 항체는 FGFR2IIIb에 결합하지만, FGFR2IIIc에는 결합하지 않는다.

[0011] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 복수의 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하는 조성물은 적어도 95% 비푸코실화된 항체를 포함한다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 복수의 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하는 조성물은 검출불가능한 푸코실화를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 푸코스의 존재는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 모세관 전기영동 또는 MALDI-TOF 질량 분광법을 포함하는 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0012] 일부 실시양태에서, 기능적 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자 (FUT8) 유전자가 결핍된, 본원에 기재된 항-FGFR2IIIb 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다.

[0013] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 제조 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포를 항-FGFR2IIIb 항체를 코딩하는 핵산을 발현하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하며, 숙주 세포가 기능적 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자 (FUT8) 유전자가 결핍된 것이다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 제조 방법은 숙주 세포를 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 생성하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체를 회수하는 것을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체의 5% 미만은 푸코스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체의 적어도 95%는 푸코스가 결핍되어 있다 (즉, 비푸코실화됨). 일부 실시양태에서, 푸코스는 숙주 세포에 의해 생성되는 항-FGFR2IIIb 항체에서 검출불가능하다. 일부 실시양태에서, 푸코스의 존재는 HPLC, 모세관 전기영동 또는 MALDI-TOF 질량 분광법을 포함하는 방법에 의해 검출된다.

[0014] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 암의 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 및 식도암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 위암이다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭은 3 초과인 FGFR2:CEN10 (염색체 10 동원체) 비율을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb의 발현 또는 과발현은 IHC에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 1+, 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC 염색은 실시예 6에서와 같이 점수화된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 암의 치료 방법은 백금 제제, 파클리탁셀, 아브락산 (ABRAXANE)®, 도세탁셀, 겐시타빈, 카

페시타빈, 이리노테칸, 에피루비신, 폴폭스 (FOLFOX), 폴피리 (FOLFIRI), 류코보린, 플루오로우라실, 미토마이신 C 및 독소루비신 히드로클로라이드로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 백금 제제는 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암의 치료 방법은 파클리탁셀을 투여하는 것을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 암의 치료 방법은 시스플라틴 및/또는 5-FU를 투여하는 것을 더 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물의 용도가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 용도는 암을 갖는 개체에서의 암의 치료를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 암은 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 또는 식도암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 위암이다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭은 3 초과와 FGFR2:CEN10 (염색체 10 동원체) 비율을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb의 발현 또는 과발현은 IHC에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 1+, 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC 염색은 실시예 6에서와 같이 점수화된다.

[0018] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 치료를 위한 제약 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 또는 식도암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 위암이다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭은 3 초과와 FGFR2:CEN10 (염색체 10 동원체) 비율을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb의 발현 또는 과발현은 IHC에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 1+, 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포에서의 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC 염색은 실시예 6에서와 같이 점수화된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1A 내지 1C는 실시예 3에서 논의된 바와 같은 FGFR2IIIb-발현 Ba/F3 세포에 대한 비푸코실화된 αFGFR2bA 및 푸코실화된 αFGFR2bF의 ADCC 활성을 나타낸다. 설명에서, "αFGFR2bF / FGFR2b"는 푸코실화된 αFGFR2bF 항체를 FGFR2IIIb-발현 Ba/F3 표적 세포에 대해 시험하였음을 지시한다.

도 2A 내지 2D는 실시예 4에서 논의된 바와 같은 OCUM-2M 위암 이종이식 모델에서의 (A 및 B) 10 mg/kg 및 (C 및 D) 3 mg/kg에서의 비푸코실화된 αFGFR2bA 및 푸코실화된 αFGFR2bF의 효능을 나타낸다.

도 3A 및 3B는 실시예 4에서 논의된 바와 같은 OCUM-2M 위암 이종이식 모델에서의 비푸코실화된 αFGFR2bA의 용량-의존성 효능을 나타낸다.

도 4A 및 4B는 실시예 4에서 논의된 바와 같은 OCUM-2M 위암 이종이식 모델에서의 비푸코실화된 αFGFR2bA 및 파클리탁셀을 사용한 조합 요법의 효능을 나타낸다.

도 5A 및 5B는 실시예 4에서 논의된 바와 같은 OCUM-2M 위암 이종이식 모델에서의 비푸코실화된 αFGFR2bA 및 5-FU/시스플라틴을 사용한 조합 요법의 효능을 나타낸다.

도 6A 및 6B는 실시예 4에서 논의된 바와 같은 MFM-223 유방암 이종이식 모델에서의 비푸코실화된 αFGFR2bA의 효능을 나타낸다.

도 7은 실시예 1에 기재된 바와 같은 (A) 포텔리젠트 (Potelligent)® CHOK1SV 세포 및 (B) CHOK1SV 세포에서 생성된 αFGFR2b 항체의 글리칸 프로파일을 나타낸다.

도 8은 항체에서 전형적으로 발견되는 N-연결된 글리칸의 개략적 도해를 나타낸다.

도 9는 증가하는 농도의 α FGFR2bA 또는 α FGFR2bF로의 Ba/F3 FGF2b 세포의 ADCC를 나타낸다. 실시예 5에 기재된 바와 같이 정상 인간 PBMC로 25:1의 E:T 비율로 어세이를 수행하였다. 데이터를 LDH 방출로서 플롯팅한다.

도 10은 증가하는 농도의 α FGFR2bA 또는 α FGFR2bF로의 OCUM-2M 세포의 ADCC를 나타낸다. 실시예 5에 기재된 바와 같이 정상 인간 PBMC로 25:1의 E:T 비율로 어세이를 수행하였다. 데이터를 퍼센트 비 용해로서 플롯팅한다.

도 11A 내지 11F는 실시예 6에 기재된 바와 같은 면역조직화학을 사용한 종양 조직 샘플에서의 FGFR2IIIb의 검출을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] FGFR2IIIb에 결합하는 비푸코실화된 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb에 결합하는 항체를 형성할 수 있는 비푸코실화된 항체 중쇄 및 경쇄가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 특정 초가변 영역 (HVR)을 포함하는 비푸코실화된 항체, 중쇄 및 경쇄가 제공된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 향상된 Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 비해 향상된 Fc 감마 RIIIA(F158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않는다.
- [0021] FGFR2IIIb에 결합하는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 항체 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 발현하는 숙주 세포가 제공된다. FGFR2IIIb에 대한 비푸코실화된 항체를 사용한 치료 방법이 제공된다. 이러한 방법은 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 및 식도암과 같은 암의 치료 방법을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0022] 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 조직적 목적을 위해서이며, 기재된 주제를 제한하는 것으로 간주되지 않는다.
- [0023] 특허 출원, 특허 공보를 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌, 및 진뱅크 수탁 번호는 각각의 개별 참고문헌이 구체적으로 및 개별적으로 그 전문이 참고로 도입되는 것으로 지시되는 것처럼 본원에 참고로 도입된다.
- [0024] 본원에 기재된 또는 참조된 기술 및 절차는 일반적으로 널리 이해되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003))]; [the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))]; [Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)]; [Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press]; [Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987)]; [Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press]; [Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons]; [Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.)]; [Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)]; [PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994)]; [Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991)]; [Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)]; [Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)]; [Antibodies (P. Finch, 1997)]; [Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; [Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; [Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; [The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]; 및 [Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993)] 및 그의 업데이트된 버

전과 같은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의한 통상적인 방법론을 사용하여 통상적으로 채용된다.

[0025] **I. 정의**

[0026] 달리 정의되지 않는다면, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 및 기술 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 내용에 의해 달리 요구되거나 명백하게 지시되지 않는다면, 단수 용어는 복수를 포함할 것이며, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다.

[0027] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태로 "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어지는" 것을 포함한다. 본원에 사용된 단수 형태 관사 ("a", "an" 및 "the")는 달리 지시되지 않는다면 복수 언급 대상을 포함한다.

[0028] 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 명백하게 언급되거나 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되지 않는다면 "및/또는"을 의미한다. 다수 종속 청구항의 내용에서, "또는"의 사용은 하나 초과와 선행하는 독립항 또는 종속항을 다시 언급한다.

[0029] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 자체의 값 또는 파라미터에 관한 실시양태를 포함한다 (및 기재한다). 예를 들어, "약 X"에 대해 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.

[0030] 용어 "핵산 분자", "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 호환적으로 사용될 수 있으며, 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 이러한 뉴클레오티드의 중합체는 천연 및/또는 비-천연 뉴클레오티드를 함유할 수 있으며, DNA, RNA 및 PNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "핵산 서열"은 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드의 선형 서열을 지칭한다.

[0031] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 호환적으로 사용되며, 최소 길이에 제한되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있으며, 아미노산 잔기의 펩티드, 올리고펩티드, 이량체, 삼량체 및 다량체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 전장 단백질 및 그의 단편 둘 다는 상기 정의에 의해 포함된다. 상기 용어는 또한 폴리펩티드의 발현후 개질(modification), 예를 들어 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 포스포릴화 등을 포함한다. 더욱이, 본 발명의 목적상, "폴리펩티드"는 단백질이 바람직한 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 결실, 부가 및 치환 (일반적으로 성질상 보존적)과 같은 개질을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이들 개질은 부위-지정 돌연변이유발을 통해서와 같이 의도적일 수 있거나, PCR 증폭으로 인한 단백질 또는 오류를 생성하는 숙주의 돌연변이를 통해서와 같이 우연적일 수 있다.

[0032] "FGFR2IIIB" 또는 "FGFR2b"는 섬유모세포 성장 인자 수용체 2 IIIB 스플라이스 형태를 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다. 예시적인 인간 FGFR2IIIB는 2013년 7월 7일자 진뱅크 수탁 번호 NP_075259.4로 나타내어진다. 비제한적인 예시적 성숙 인간 FGFR2IIIB 아미노산 서열은 서열 1로 나타내어진다.

[0033] "FGFR2IIIC" 또는 "FGFR2c"는 섬유모세포 성장 인자 수용체 2 IIIC 스플라이스 형태를 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다. 예시적인 인간 FGFR2IIIC는 2013년 7월 7일자 진뱅크 수탁 번호 NP_000132.3으로 나타내어진다. 비제한적인 예시적 인간 성숙 FGFR2IIIC 아미노산 서열은 서열 12로 나타내어진다.

[0034] 용어 "에피토프"는 항원-결합 분자 (예를 들어, 항체, 항체 단편, 또는 항체 결합 영역을 함유하는 스캐폴드 단백질)가 결합하는 표적 분자 (예를 들어, 항원, 예컨대 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 지질) 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 대개 아미노산, 폴리펩티드 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 기로 이루어지며, 특이적 3차원 구조적 특징 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다. 에피토프는 표적 분자의 인접한 또는 병치된 비인접한 잔기 (예를 들어, 아미노산, 뉴클레오티드, 당, 지질 모이어티) 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접한 잔기 (예를 들어, 아미노산, 뉴클레오티드, 당, 지질 모이어티)로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출시 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로 처리시 소실된다. 에피토프는 적어도 3개, 적어도 5개 또는 8 내지 10개의 잔기 (예를 들어, 아미노산 또는 뉴클레오티드)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 예에서, 에피토프는 길이로 20개 미만의 잔기 (예를 들어, 아미노산 또는 뉴클레오티드), 15개 미만의 잔기 또는 12개 미만의 잔기이다. 2가지 항체는 이들이 항원에 대해 경쟁적 결합을 나타내는 경우 항원 내에서 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0035] "비선형 에피토프" 또는 "입체적 에피토프"는 에피토프에 특이적인 항체가 결합하는 항원성 단백질 내에 비인접한 폴리펩티드, 아미노산 및/또는 당을 포함한다.

- [0036] "선형 에피토프"는 에피토프에 특이적인 항체가 결합하는 항원성 단백질 내에 인접한 폴리펩티드, 아미노산 및/또는 당을 포함한다.
- [0037] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 바람직한 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다.
- [0038] 용어 항체는 Fv, 단일-쇄 Fv (scFv), Fab, Fab' 및 (Fab')₂와 같은 항원에 결합할 수 있는 단편을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 그의 명칭이 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하는 잔류의 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원에 가교할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다. 용어 항원은 또한 키메라 항체, 인간화 항체, 및 마우스, 인간, 시노물구스 원숭이 등과 같은 다양한 종의 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 용어 "중쇄 가변 영역"은 중쇄 HVR1, 프레임워크 (FR) 2, HVR2, FR3 및 HVR3을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 또한 FR1의 적어도 일부 및/또는 FR4의 적어도 일부를 포함한다.
- [0040] 용어 "중쇄 불변 영역"은 적어도 3개의 중쇄 불변 도메인, C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적 중쇄 불변 영역으로는 γ , δ 및 α 를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 중쇄 불변 영역으로는 또한 ϵ 및 μ 를 들 수 있다. 각각의 중쇄 불변 영역은 항체 이소형에 상응한다. 예를 들어, γ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgG 항체이고, δ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgD 항체이고, α 불변 영역을 포함하는 항체는 IgA 항체이다. 또한, μ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgM 항체이고, ϵ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgE 항체이다. 특정 이소형은 하위부류로 더 세분될 수 있다. 예를 들어, IgG 항체는 IgG1 (γ_1 불변 영역을 포함함), IgG2 (γ_2 불변 영역을 포함함), IgG3 (γ_3 불변 영역을 포함함) 및 IgG4 (γ_4 불변 영역을 포함함) 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않고; IgA 항체는 IgA1 (α_1 불변 영역을 포함함) 및 IgA2 (α_2 불변 영역을 포함함) 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않고; IgM 항체는 IgM1 및 IgM2를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0041] 용어 "중쇄"는 리더 서열을 갖거나 갖지 않는 적어도 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 용어 "전장 중쇄"는 리더 서열을 갖거나 갖지 않는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0042] 용어 "경쇄 가변 영역"은 경쇄 HVR1, 프레임워크 (FR) 2, HVR2, FR3 및 HVR3을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 또한 FR1 및/또는 FR4를 포함한다.
- [0043] 용어 "경쇄 불변 영역"은 경쇄 불변 도메인, C_L을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적 경쇄 불변 영역으로는 λ 및 κ 를 들 수 있다.
- [0044] 용어 "경쇄"는 리더 서열을 갖거나 갖지 않는 적어도 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 용어 "전장 경쇄"는 리더 서열을 갖거나 갖지 않는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0045] 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에서 초가변적이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; V_H에 3개 (H1, H2, H3), 및 V_L에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 가장 높은 서열 가변성의 것이고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26 내지 32 (L1), 50 내지 52 (L2), 91 내지 96 (L3), 26 내지 32 (H1), 53 내지 55 (H2) 및 96 내지 101 (H3)에서 일어난다 (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 아미노산 잔기 L1의 24 내지 34, L2의 50 내지 56, L3의 89 내지 97, H1의 31 내지 35B, H2의 50 내지 65 및 H3의 95 내지 102에서 일어난다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 용어 초가변 영역 (HVR) 및 상보성 결정 영역 (CDR)은 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 일부에 관하여 본원에서 호환적으로 사용된다.
- [0046] 본원의 목적상 "수용체 인간 프레임워크"는 하기 정의된 바와 같은 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간

컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (V_L) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (V_H) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 수용체 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하 또는 2 이하이다. 일부 실시양태에서, V_L 수용체 인간 프레임워크는 V_L 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

- [0047] "친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 상대 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 지칭한다. 일부 실시양태에서, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 상대 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 나타내어질 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것들을 비롯한 관련 기술분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0048] "친화도 성숙된" 항체는 변형을 갖지 않는 모 항체에 비해 하나 이상의 초가변 영역 (HVR) 및/또는 상보성 결정 영역 (CDR)에 하나 이상의 변형을 갖는 항체를 지칭하며, 이러한 변형은 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 초래한다.
- [0049] "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 공급원 또는 종으로부터 유래되는 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체는 제 1 종 (예컨대 마우스, 래트, 시노몰구스 원숭이 등)으로부터의 적어도 하나의 가변 영역 및 제2 종 (예컨대 인간, 시노몰구스 원숭이 등)으로부터의 적어도 하나의 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 마우스 가변 영역 및 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 시노몰구스 가변 영역 및 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체의 모든 가변 영역은 제1 종으로부터의 것이고, 키메라 항체의 모든 불변 영역은 제2 종으로부터의 것이다.
- [0050] "인간화 항체"는 비-인간 가변 영역의 프레임워크 영역의 적어도 하나의 아미노산이 인간 가변 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 하나의 인간 불변 영역 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 Fab, scFv, (Fab')₂ 등이다.
- [0051] "HVR-그래프팅된 항체"는 제1 (비-인간) 종의 하나 이상의 초가변 영역 (HVR)이 제2 (인간) 종의 프레임워크 영역 (FR) 상으로 그래프팅된 인간화 항체를 지칭한다.
- [0052] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"으로는 Fc 수용체 결합; C1q 결합; CDC; ADCC; 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 들 수 있다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합된 Fc 영역을 요구하며, 다양한 어세이를 사용하여 평가될 수 있다.
- [0053] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 그의 천연 발생 변이체를 포함한다.
- [0054] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 개질에 의해 천연 서열 Fc 영역과 상이한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0055] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 일부 실시양태에서, Fc γ R은 천연 인간 FcR이다. 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체에 결합하는 것 (감마 수용체)이며, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체를 포함하고, 이는 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하며, 이는 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (예를 들어, 문헌 [Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]; [Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)]에 검토되어 있다. 미래에 확인될 것들을 포함하여 다른 FcR은 본원의 용어 "FcR"에 의해

포함된다.

- [0056] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG의 태아에의 수송 (문헌 [Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)]) 및 이뮤노글로불린의 항상성의 조절을 담당하는 신생아 수용체, FcRn을 포함한다. FcRn에의 결합의 측정 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997)]; [Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997)]; [Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)]; WO 2004/92219 (힌톤 (Hinton) 등 참조).
- [0057] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 다양한 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예로는 Clq 결합 및 보체 의존적 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 들 수 있다.
- [0058] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하며 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 특정 실시양태에서, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하며, ADCC 이펙터 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 대식세포, 세포독성 T 세포 및 호중구를 들 수 있다. 이펙터 세포는 천연 공급원으로부터, 예를 들어 혈액으로부터 분리될 수 있다.
- [0059] "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어 NK 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR) 상으로 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-함유 표적 세포에 특이적으로 결합하고, 이어서 표적 세포를 사이토크신으로 살해하는 것을 가능하게 하는 세포독성의 형태를 지칭한다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]의 464면 표 3에 요약되어 있다. 관심의 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제 5,500,362호 또는 제5,821,337호 또는 미국 특허 제6,737,056호 (프레스타 (Presta))에 기재된 것과 같은 시험 관내 ADCC 어세이가 수행될 수 있다. 이러한 어세이에 유용한 이펙터 세포로는 PBMC 및 NK 세포를 들 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심의 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가된 또는 감소된 ADCC 활성을 갖는 추가의 항체는 예를 들어 미국 특허 제7,923,538호 및 미국 특허 제7,994,290호에 기재되어 있다.
- [0060] "향상된 ADCC 활성"을 갖는 항체는 항체 및 모 항체가 적어도 하나의 구조적 측면에서 상이하고, 어세이에 사용된 이러한 항체 및 모 항체의 양이 본질적으로 동일할 경우, 모 항체에 비해 시험관내 또는 생체내에서 ADCC를 매개하는 데 보다 유효한 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항체 및 모 항체는 동일한 아미노산 서열을 갖지만, 항체는 비푸코실화된 반면, 모 항체는 푸코실화된다. 일부 실시양태에서, ADCC 활성은 본원에 개시된 바와 같은 시험관내 ADCC 어세이를 사용하여 측정될 것이지만, 예를 들어 동물 모델 등에서 ADCC 활성을 측정하는 다른 어세이 또는 방법도 고려된다. 일부 실시양태에서, 향상된 ADCC 활성을 갖는 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 향상된 ADCC 활성을 갖는 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA (V158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 향상된 ADCC 활성을 갖는 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA (F158)에 대한 친화도를 갖는다.
- [0061] "변경된" FcR 결합 친화도 또는 ADCC 활성을 갖는 항체는 모 항체에 비해 향상된 또는 감소된 FcR 결합 활성 및/또는 ADCC 활성을 갖는 것이며, 여기서 항체 및 모 항체는 적어도 하나의 구조적 측면에서 상이하다. FcR에의 "증가된 결합을 나타내는" 항체는 모 항체보다 양호한 친화도로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. FcR에의 "감소된 결합을 나타내는" 항체는 모 항체보다 낮은 친화도로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. FcR에의 감소된 결합을 나타내는 이러한 항체는 FcR에의 거의 또는 전혀 감지할 수 없는 결합, 예를 들어 천연 서열 IgG Fc 영역에 비해 0 내지 20%의 FcR에의 결합을 가질 수 있다.
- [0062] "향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도"는 모 항체보다 더 큰 Fc 감마 RIIIA (또한 일부 예에서 CD16a로도 지칭됨)에 대한 친화도를 갖는 항체를 지칭하며, 여기서 항체 및 모 항체는 적어도 하나의 구조적 측면에서 상이하다. 일부 실시양태에서, 항체 및 모 항체는 동일한 아미노산 서열을 갖지만, 항체는 비푸코실화된 반면, 모 항체는 푸코실화된다. Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 측정하는 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도는 본원에 기재된 방법에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는 항체는 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(F158)에 대한 친화도를 갖는다.

- [0063] "비푸코실화된" 항체 또는 "푸코스가 결핍된 항체"는 그의 불변 영역 글리코실화에서 푸코스가 결핍된 IgG1 또는 IgG3 이소형 항체를 지칭한다. 인간 IgG1 또는 IgG3의 글리코실화는 2개 이하의 Gal 잔기로 종결된 코어 푸코실화된 이중안테나성 복합체 올리고당류 글리코실화로서 Asn297에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항체는 Asn297에서 푸코스가 결핍되어 있다. 이들 구조는 말단 Gal 잔기의 양에 따라 G0, G1 ($\alpha 1,6$ 또는 $\alpha 1,3$) 또는 G2 글리칸 잔기로 표시된다. 예를 들어, 문헌 [Raju, T. S., *BioProcess Int.* 1: 44-53 (2003)]을 참조한다. 항체 Fc의 CHO 유형 글리코실화는 예를 들어 문헌 [Routier, F. H., *Glycoconjugate J.* 14: 201-207 (1997)]에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 비 글리코게질된 CHO 숙주 세포에서 재조합적으로 발현된 항체의 배치의 적어도 85%는 Asn297에서 푸코실화된다. 복수의 항체를 포함하는 조성물을 지칭할 경우, 항체는 조성물 중의 항체의 5% 미만이 Asn297에서 푸코스를 포함할 경우 비푸코실화된 것으로 간주된다. 푸코스의 측정 방법은 본원에 기재된 방법을 비롯하여 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 푸코스는 실시예 1에 기재된 방법에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 푸코스는 복수의 비푸코실화된 항체를 포함하는 조성물에서 검출불가능하다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항체는 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(F158)에 대한 친화도를 갖는다.
- [0064] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전형적인 보체 경로의 활성화는 그의 동족 항원에 결합된 (적절한 하위부류의) 항체와의 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 어세이가 수행될 수 있다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가된 또는 감소된 C1q 결합 용량을 갖는 항체는 예를 들어 미국 특허 제6,194,551 B1호, 미국 특허 제7,923,538호, 미국 특허 제7,994,290호 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.
- [0065] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 2개 이상의 값 사이의 차이가 상기 값에 의해 측정되는 생물학적 특징의 내용 내에서 거의 또는 전혀 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 없는 것으로 간주하도록 2개 이상의 수치 값 사이의 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 실질적으로 유사한 값은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 50% 중 임의의 하나 이하로 상이하다.
- [0066] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 2개의 값 사이의 차이가 상기 값에 의해 측정되는 생물학적 특징의 내용 내에서 통계학적으로 유의한 것으로 간주하도록 2개의 수치 값 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 2개의 실질적으로 상이한 수치 값은 약 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 중 임의의 하나 초과만큼 상이하다.
- [0067] 용어 "리더 서열" 및 "신호 서열"은 포유동물 세포로부터의 폴리펩티드의 분비를 용이하게 하는 폴리펩티드의 N 말단에 위치한 아미노산 잔기의 서열을 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다. 리더 서열은 포유동물 세포로부터 폴리펩티드의 방출시 절단되어 성숙한 단백질을 형성할 수 있다. 리더 서열은 천연 또는 합성일 수 있으며, 이들은 이들이 부착되는 단백질에 대해 이중성 또는 상동성일 수 있다.
- [0068] "천연 서열" 폴리펩티드는 자연에서 발견되는 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 폴리펩티드는 임의의 포유동물로부터의 천연 발생 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 천연 서열 폴리펩티드는 자연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 용어 "천연 서열" 폴리펩티드는 구체적으로 폴리펩티드의 천연 발생 말단절단된 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 선택적으로 스플라이싱된 형태) 및 폴리펩티드의 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다.
- [0069] 폴리펩티드 "변이체"는 필요할 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않는, 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적으로 활성인 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 변이체는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 N- 또는 C-말단에서 부가된 또는 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 천연 서열 폴리펩티드와 적

어도 약 95% 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다.

[0070] 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 관해 본원에 사용된 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성" 및 "상동성"은 필요할 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않는, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성의 측정의 목적을 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN™ (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 관련 기술분야의 기술 내에 있는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0071] 아미노산 치환은 폴리펩티드 중의 하나의 아미노산의 또다른 아미노산으로의 대체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 보존적 치환은 표 1에 "바람직한 치환"이라는 제목 하에 나타나 있다. 보다 실질적인 변화는 표 1에 "예시적인 치환"이라는 제목 하에 제공되어 있으며, 또한 아미노산 측쇄 부류에 관해 하기에 추가로 기재된 바와 같다. 아미노산 치환은 관심의 항체 내로 도입될 수 있으며, 생성물은 바람직한 활성, 예를 들어 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0072] <표 1>

원래 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

[0073]

[0074] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 하기와 같이 그룹화될 수 있다:

[0075] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0076] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0077] (3) 산성: Asp, Glu;

[0078] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

- [0079] (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0080] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0081] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [0082] 용어 "백터"는 숙주 세포에 전파될 수 있는 클로닝된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 함유하도록 유전자조작될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 기재하기 위해 사용된다. 백터는 하기 요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 복제 원점, 관심의 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서), 및/또는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자 (예를 들어, 항생제 저항성 유전자 및 비색 어 세이에 사용될 수 있는 유전자, 예를 들어 β -갈락토시다제). 용어 "발현 백터"는 숙주 세포에서 관심의 폴리펩티드를 발현시키기 위해 사용되는 백터를 지칭한다.
- [0083] "숙주 세포"는 백터 또는 단리된 폴리뉴클레오티드의 수용자일 수 있거나 수용자였던 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 예시적인 진핵 세포로는 포유동물 세포, 예컨대 영양류 또는 비-영양류 동물 세포; 진균 세포, 예컨대 효모; 식물 세포; 및 곤충 세포를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 포유 동물 세포로는 NSO 세포, PER.C6[®] 세포 (크루셀 (CruCell)), 및 293 및 CHO 세포, 및 그의 유도체, 예컨대 각각 293-6E 및 DG44 세포를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0084] 용어 "단리된"은 그것이 전형적으로 자연에서 발견되거나 생성되는 성분의 적어도 일부로부터 분리된 분자를 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 그것이 생성된 세포의 성분의 적어도 일부로부터 분리된 경우 "단리된" 것으로 지칭된다. 폴리펩티드가 발현 후 세포에 의해 분비되는 경우, 그것을 생성한 세포로부터의 폴리펩티드를 함유하는 상청액을 물리적으로 분리하는 것은 폴리펩티드를 "단리하는" 것으로 간주된다. 유사하게, 폴리펩티드는 그것이 전형적으로 자연에서 발견되는 보다 큰 폴리뉴클레오티드의 일부가 아닌 경우 (예를 들어, DNA 폴리뉴클레오티드의 경우, 게놈 DNA 또는 미토콘드리아 DNA), 또는 예를 들어 RNA 폴리뉴클레오티드의 경우 그것이 생성된 세포의 성분의 적어도 일부로부터 분리된 경우 "단리된" 것으로 지칭된다. 따라서, 숙주 세포 내부의 백터에 함유된 DNA 폴리뉴클레오티드는 "단리된" 것으로 지칭될 수 있다.
- [0085] 용어 "개체" 또는 "대상체"는 동물; 예를 들어 포유동물을 지칭하기 위해 본원에서 호환적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 인간, 설치류, 원숭이, 고양이, 개, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 포유동물 실험실 동물, 포유동물 농장 동물, 포유동물 경기용 동물 및 포유동물 애완동물을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물의 치료 방법이 제공된다. 일부 예에서, "개체" 또는 "대상체"는 질환 또는 장애의 치료가 필요한 개체 또는 대상체를 지칭한다.
- [0086] "질환" 또는 "장애"는 치료가 필요한 상태를 지칭한다.
- [0087] 용어 "암"은 비제어된 세포 증식, 비제한된 세포 성장, 및 아폽토시스를 통한 감소된 세포 사멸과 관련된 악성 증식성 장애를 지칭한다. 비제한적인 예시적 암으로는 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 및 식도암을 들 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭은 3 초과 FGFR2:CEN10 (염색체 10 동원체) 비율을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 유전자 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 위암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 유전자 증폭을 포함하는 위암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 위암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 위암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 위암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 과발현은 mRNA 과발현이다. 일부 실시양태에서, 과발현은 단백질 과발현이다.
- [0088] 용어 "종양"은 본원에서 비정상적으로 높은 수준의 증식 및 성장을 나타내는 세포의 군을 지칭하기 위해 사용된다. 종양은 양성, 전-악성 또는 악성일 수 있으며; 악성 종양 세포는 암성이다. 종양 세포는 고형 종양 세포 또는 백혈병 종양 세포일 수 있다. 용어 "종양 성장"은 본원에서 종양의 크기의 상응하는 증가를 초래하는 증

양을 포함하는 세포 또는 세포들에 의한 증식 또는 성장을 지칭하기 위해 사용된다.

- [0089] 본원에 사용된 "치료"는 유익한 또는 바람직한 임상적 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본원에 사용된 "치료"는 인간을 비롯한 포유동물에서의 질환을 위한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 커버한다. 본 발명의 목적상, 유익한 또는 바람직한 임상적 결과는 하나 이상의 증상의 경감, 질환의 정도의 감소, 질환의 확산 (예를 들어, 전이, 예를 들어 폐로의 또는 림프절로의 전이)의 방지 또는 지연, 질환의 재발의 방지 또는 지연, 질환 진행의 지연 또는 감속, 질환 상태의 개선, 질환 또는 질환의 진행의 억제, 질환 또는 그의 진행의 억제 또는 감속, 그의 발달의 정지 및 차도 (부분적이든 또는 전체적이든) 중 임의의 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, "치료"에는 증식성 질환의 병리학적 결과의 감소가 포함된다. 본 발명의 방법은 치료의 이들 측면 중 임의의 하나 이상을 고려한다.
- [0090] 암의 내용에서, 용어 "치료하는 것"은 종양 세포 또는 암 세포의 성장의 억제, 종양 세포 또는 암 세포의 복제의 억제, 전체 종양 부하량의 감소 및 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 개선 중 임의의 것 또는 전체를 포함한다.
- [0091] 용어 "억제" 또는 "억제하다"는 임의의 표현형적 특징의 감소 또는 중지, 또는 그 특징의 발생, 정도 또는 가능성의 감소 또는 중지를 지칭한다. "감소시키거나" 또는 "억제하는" 것은 참조물에 비해 활성, 기능 및/또는 양을 축소시키거나, 감소시키거나, 정지시키는 것이다. 특정 실시양태에서, "감소시키다" 또는 "억제하다"는 20% 이상의 전체적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 또다른 실시양태에서, "감소시키다" 또는 "억제하다"는 50% 이상의 전체적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 또다른 실시양태에서, "감소시키다" 또는 "억제하다"는 75%, 85%, 90%, 95% 이상의 전체적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다.
- [0092] 본원에 사용된 "참조물"은 비교 목적으로 사용되는 임의의 샘플, 표준 또는 수준을 지칭한다. 참조물은 건강한 및/또는 비-질환 샘플로부터 얻어질 수 있다. 일부 예에서, 참조물은 비처리된 샘플로부터 얻어질 수 있다. 일부 예에서, 참조물은 대상 개체의 비-질환 또는 비-처리 샘플로부터 얻어진다. 일부 예에서, 참조물은 대상체 또는 환자가 아닌 하나 이상의 건강한 개체로부터 얻어진다.
- [0093] 본원에 사용된 "질환의 발달의 지연"은 질환 (예컨대 암)의 발달의 연기, 저해, 감속, 지연, 안정화, 억제 및/또는 유예를 의미한다. 이 지연은 질환의 내력 및/또는 치료되는 개체에 따라 시간의 길이를 다양화하는 것일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의한 지연은 효과상 예방을 포함할 수 있으며, 즉 개체는 질환을 발달시키지 않는다. 예를 들어, 후기 단계 암, 예컨대 전이의 발달은 지연될 수 있다.
- [0094] 본원에 사용된 "예방하는 것"은 질환에 걸릴 성향이 있을 수 있지만 아직 질환으로 진단되지 않은 대상체에서의 질환의 발생 또는 재발에 관한 예방을 제공하는 것을 포함한다.
- [0095] 본원에 사용된 기능 또는 활성을 "억제하는" 것은 관심의 상태 또는 파라미터를 제외하고는 다른 것은 동일한 조건에 비교할 경우, 또는 대안적으로 또다른 상태에 비해, 기능 또는 활성을 감소시키는 것이다. 예를 들어, 종양 성장을 억제하는 항체는 항체의 부재 하에서의 종양의 성장 속도에 비해 종양의 성장 속도를 감소시킨다.
- [0096] 제제의 "유효량"은 투여량에서 및 필요한 기간 동안, 바람직한 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는 데 유효한 양을 지칭한다.
- [0097] 본 발명의 물질/분자, 아고니스트 또는 길항제의 "치료적 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자, 및 개체에서 바람직한 반응을 유발하는 물질/분자, 아고니스트 또는 길항제의 능력에 따라 다양할 수 있다. 치료적 유효량은 또한 물질/분자, 아고니스트 또는 길항제의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료적으로 유익한 효과가 더 큰 것이다. 치료적 유효량은 하나 이상의 투여로 전달될 수 있다.
- [0098] "예방적 유효량"은 투여량에서 및 필요한 기간 동안, 바람직한 예방적 결과를 달성하는 데 유효한 양을 지칭한다. 전형적이지만 필수적이지는 않게, 예방적 용량은 질환의 이전 또는 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 작을 것이다.
- [0099] 용어 "제약 제제" 및 "제약 조성물"은 활성 성분(들)의 생물학적 활성이 유효하게 되는 것을 허용하도록 하는 형태이고, 제제가 투여될 대상체에 대해 수용할 수 없게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균성일 수 있다.
- [0100] "제약학적으로 허용되는 담체"는 대상체에게 투여하기 위한 "제약 조성물"을 함께 포함하는 치료제와 함께 사용하기 위한 관련 기술분야에서 통상적인 비-독성 고체, 반고체, 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질, 제제

보조제 또는 담체를 지칭한다. 제약학적으로 허용되는 담체는 채용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비-독성이며, 제제의 다른 성분과 혼화성이다. 제약학적으로 허용되는 담체는 채용되는 제제에 대해 적절하다.

[0101] "멸균" 제제는 무균성이거나, 살아있는 미생물 및 그의 포자가 본질적으로 없다.

[0102] 하나 이상의 추가의 치료제와 "조합으로" 투여는 동시 (병행) 및 임의의 순서로의 연속적 또는 순차적 투여를 포함한다.

[0103] 용어 "병행하여"는 본원에서 투여의 적어도 일부가 시간적으로 중복되거나, 하나의 치료제의 투여가 다른 치료제의 투여에 비해 짧은 기간 내에 해당하는 2종 이상의 치료제의 투여를 지칭한다. 예를 들어, 2종 이상의 치료제는 약 60분 이하, 예컨대 약 30, 15, 10, 5 또는 1분 중 임의의 것 이하의 시간 간격으로 투여된다.

[0104] 용어 "순차적으로"는 본원에서 1종 이상의 제제(들)의 투여가 1종 이상의 다른 제제(들)의 투여를 중단한 후 연속되는 2종 이상의 치료제의 투여를 지칭한다. 예를 들어, 2종 이상의 치료제의 투여는 약 15분 초과, 예컨대 약 20, 30, 40, 50 또는 60분, 1일, 2일, 3일, 1주, 2주 또는 1개월 중 임의의 것 또는 그 이상의 시간 간격으로 투여된다.

[0105] 본원에 사용된 "와 함께"는 하나의 치료 양상에 추가로 또다른 치료 양상의 투여를 지칭한다. 즉, "와 함께"는 개체에게 하나의 치료 양상의 투여 전, 동안 또는 후의 또다른 치료 양상의 투여를 지칭한다.

[0106] 용어 "패키지 삽입물"은 치료제 제품의 사용에 관한 지시, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 사용금지사유 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 이러한 치료제 제품의 상업적 패키지에 통상적으로 포함된 지시서를 지칭하기 위해 사용된다.

[0107] "제조품"은 적어도 1종의 시약, 예를 들어 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)의 치료를 위한 의약, 또는 본원에 기재된 바이오마커를 특이적으로 검출하기 위한 프로브를 포함하는 임의의 제품 (예를 들어, 패키지 또는 용기) 또는 키트이다. 특정 실시양태에서, 제품 또는 키트는 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 유닛으로서 판촉, 분포 또는 판매된다.

[0108] II. 항-FGFR2IIIb 항체

[0109] 일부 측면에서, 본 발명은 FGFR2IIIb에 대해 지정된 비푸코실화된 항체를 제공한다. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 인간화 항체, 키메라 항체, 마우스 항체, 및 본원에서 논의된 중쇄 및/또는 경쇄 HVR (예를 들어 CDR)을 포함하는 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, 본 발명은 FGFR2IIIb에 결합하는 단리된 비푸코실화된 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb 활성을 조절한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(F158)에 대한 친화도를 갖는다.

[0110] 본원에서 실시예 및 서열 목록에 기재된 "a FGFR2b"로 표시된 항-FGFR2IIIb 항체는 2012년 1월 24일에 허여된 미국 특허 제8,101,723 B2호의 항체 HuGAL-FR21과 동일한 아미노산 서열을 갖는 것으로 의도된다. 미국 특허 제8,101,723 B2호는 구체적으로 임의의 목적으로 본원에 참고로 도입되며, 특히 HuGAL-FR21의 가변 영역 및 전장 성숙 항체 쇄의 아미노산 서열을 나타내는 미국 특허 제8,101,723 B2호의 도 13 및 14는 임의의 목적으로 본원에 참고로 도입된다. 또한, 미국 특허 제8,101,723 B2호의 도 13에서 밑줄로 표시된 항체 HuGAL-FR21의 HVR 서열은 구체적으로 임의의 목적으로 본원에 참고로 도입된다.

[0111] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR (예를 들어, CDR)을 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 제공한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 중쇄, 및 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 각각의 중쇄가 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 2개의 중쇄, 및 각각의 경쇄가 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일

부를 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0113] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 6개의 HVR을 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 상기 기재된 바와 같은 6개의 HVR을 포함하고, FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 상기 기재된 바와 같은 6개의 HVR을 포함하고, FGFR2IIIb에 결합하며, 향상된 ADCC 활성 및 향상된 Fc 감마 RIIIA (예컨대 Fc 감마 RIIIA(V158) 및/또는 Fc 감마 RIIIA(F158))에 대한 친화도로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않는다.

[0114] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 6개의 HVR을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체와 경쟁하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 제공한다.

[0115] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 V_H HVR 서열을 포함하는 비푸코실화된 항체를 제공한다.

[0116] 또다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 V_L HVR 서열을 포함하는 비푸코실화된 항체를 제공한다.

[0117] 또다른 측면에서, 본 발명의 비푸코실화된 항체는 (a) (i) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열 8로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 V_H HVR 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 (b) (i) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (iii) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 V_L HVR 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다.

[0118] 또다른 측면에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (V_H) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 V_H 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 4에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 그 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 5의 V_H 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, V_H 는 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0119] 또다른 측면에서, 서열 5의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 V_L 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-

FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 5에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 그 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 4의 V_L 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, V_L 은 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0120] 또다른 측면에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (V_H) 서열 및 서열 5의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 V_H 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하고, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 V_L 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 4에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 5에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 하나 또는 둘 다의 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 4의 V_H 서열 및 서열 5의 V_L 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, V_H 는 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함하고; V_L 은 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0121] 또다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 V_H , 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 V_L 을 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 그들 서열의 번역후 개질을 포함하여, 각각 서열 4 및 서열 5의 V_H 및 V_L 서열을 포함한다.

[0122] 또다른 측면에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 2의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 2에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 그 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 2의 V_H 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄는 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0123] 또다른 측면에서, 서열 3의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 3에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 그 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 3의 V_L 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄는 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포

합하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0124] 또다른 측면에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 2의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 서열 3의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIb에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않고 FGFR2IIIb에 선택적으로 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 2에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 3에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 중쇄는 그 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 2의 V_H 서열을 포함하며, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 경쇄는 그 서열의 번역후 개질을 포함하여 서열 3의 V_L 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄는 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함하고; 경쇄는 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0125] **예시적인 키메라 항체**

[0126] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 비푸코실화된 항체와 같은 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison *et al.*, (1984) *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 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 전환된 (class switched)" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0127] 비제한적인 예시적 비푸코실화된 키메라 항체로는 본원에 기재된 중쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3, 및/또는 경쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3을 포함하는 키메라 항체를 들 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 상기 기재된 가변 영역을 포함하고, FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 상기 기재된 가변 영역을 포함하고, FGFR2IIIb에 결합하며, 향상된 ADCC 활성 및 향상된 Fc 감마 RIIC (예컨대 Fc 감마 RIIC(V158) 및/또는 Fc 감마 RIIC(F158))에 대한 친화도로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않는다.

[0128] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄를 포함하며, 항체는 FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 5와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, 항체는 FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열 5와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄를 포함하며, 항체는 FGFR2IIIb에 결합한다.

[0129] 예시적인 비푸코실화된 키메라 항-FGFR2IIIb 항체는 또한 FGFR2IIIb에의 결합에 대해 본원에 기재된 항체 또는 그의 단편과 경쟁하는 키메라 항체를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb에의 결합에 대해 서열

4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는 키메라 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 FGFR2IIIb에의 결합에 대해 경쟁하지만, FGFR2IIIc에 결합하지 않는다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항체는 하나 이상의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgA, IgG 및 IgD로부터 선택되는 이소형의 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 경쇄 불변 영역은 κ 및 λ 로부터 선택되는 이소형의 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항체는 인간 IgG 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항체는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항체는 인간 IgG4 불변 영역 및 인간 κ 경쇄를 포함한다.

[0131] 상기 주목된 바와 같이, 이펙터 기능이 바람직한지 여부는 항체에 대해 의도되는 특정 치료 방법에 의존할 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이펙터 기능이 바람직할 경우, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 인간 IgG3 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항-FGFR2IIIb 항체가 선택된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능이 바람직하지 않을 경우, 인간 IgG4 또는 IgG2 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항-FGFR2IIIb 항체가 선택된다.

[0132] 예시적인 인간화 항체

[0133] 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb에 결합하는 비푸코실화된 인간화 항체가 제공된다. 인간화 항체는 인간화 항체가 항체 치료제에 대한 면역 반응, 및 치료제의 감소된 유효성을 초래할 수 있는 비-인간 항체에 대한 인간 면역 반응 (예컨대 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 반응)을 감소시키거나 제거하기 때문에 치료제 분자로서 유용하다.

[0134] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)가 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의로 또한 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복구시키거나 개선시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어 HVR 잔기가 유래되는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0135] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633]에 검토되어 있으며, 추가로 예를 들어 문헌 [Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-329]; [Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033]; 미국 특허 제5,821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호 및 제7,087,409호; 문헌 [Kashmiri *et al.*, (2005) *Methods* 36:25-34 (SDR (a-CDR) 그래프팅을 기재함)]; [Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498] ("재표면가공"을 기재함); [Dall'Acqua *et al.*, (2005) *Methods* 36:43-60] ("FR 서플링"을 기재함); 및 [Osbourn *et al.*, (2005) *Methods* 36:61-68] 및 [Klimka *et al.*, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260] (FR 서플링에 대한 "안내된 선택" 접근법을 기재함)에 기재되어 있다.

[0136] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "가장-적합한" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151 :2296] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285]; 및 [Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2623] 참조); 인간 성숙 (체세포적으로 성숙된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식세포계열 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633] 참조); 및 FR 라이브러리의 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684] 및 [Rosok *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0137] 비제한적인 예시적 인간화 항체로는 본원에 기재된 α FGFR2b를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 비푸코실화된 인간화 항체로는 푸코스를 포함하는 α FGFR2b (또한 α FGFR2bF로도 지칭됨)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 본원에 기재된 α FGFR2bA를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 비푸코실화된 인간화 항체로는 또한 α FGFR2b의 중쇄 가변 영역 및/또는 α FGFR2b의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 비푸코실화된 인간화 항체로는 서열 4의 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 5의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 들 수 있다. 예시적인 인간화 항체로는 또한 α FGFR2b의 중쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3, 및/또는 경쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3을 포

합하는 인간화 항체를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 상기 기재된 HVR (즉, (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3)을 포함하고, FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 상기 기재된 HVR을 포함하고, FGFR2IIIb에 결합하며, 향상된 ADCC 활성 및 향상된 Fc 감마 RIIIA (예컨대 Fc 감마 RIIIA(V158) 및/또는 Fc 감마 RIIIA(F158))에 대한 친화도로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않는다.

[0138] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 αFGFR2b의 중쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3 및/또는 경쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3을 포함한다. 비제한적인 예시적 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체로는 서열 6, 7 및 8에 설명된 중쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3의 세트를 포함하는 항체를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체로는 또한 서열 9, 10 및 11에 설명된 경쇄 HVR1, HVR2 및 HVR3의 세트를 포함하는 항체를 들 수 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄를 포함하며, 항체는 FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 5와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, 항체는 FGFR2IIIb에 결합한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 서열 4와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열 5와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며; 항체는 FGFR2IIIb에 결합한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 본원에서 논의된 HVR 중 적어도 하나를 포함한다. 즉, 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 본원에서 논의된 중쇄 HVR1, 본원에서 논의된 중쇄 HVR2, 본원에서 논의된 중쇄 HVR3, 본원에서 논의된 경쇄 HVR1, 본원에서 논의된 경쇄 HVR2 및 본원에서 논의된 경쇄 HVR3으로부터 선택되는 적어도 하나의 HVR을 포함한다. 또한, 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 돌연변이된 HVR이 본원에서 논의된 HVR에 비해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는, 본원에서 논의된 HVR에 기재하는 적어도 하나의 돌연변이된 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 적합한 보존적 아미노산 치환이 돌연변이된 HVR을 포함하는 항체의 결합 특성을 유의하게 변경하는 것으로 예측되지 않는 특정 HVR 서열에 대한 하나 이상의 적합한 보존적 아미노산 치환을 선택할 수 있다.

[0141] 예시적인 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 또한 FGFR2IIIb에의 결합에 대해 본원에 기재된 항체 또는 그의 단편과 경쟁하는 항체를 들 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb에의 결합에 대해 αFGFR2b와 경쟁하는 인간화 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb에의 결합에 대해 αFGFR2b와 경쟁하고, 향상된 ADCC 활성 및 향상된 Fc 감마 RIIIA (예컨대 Fc 감마 RIIIA(V158) 및/또는 Fc 감마 RIIIA(F158))에 대한 친화도로부터 선택되는 적어도 하나의 활성을 갖는 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 FGFR2IIIc에 결합하지 않는다.

[0142] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체는 하나 이상의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgA, IgG 및 IgD로부터 선택되는 이소형의 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 경쇄 불변 영역은 κ 및 λ로부터 선택되는 이소형의 것이다.

[0143] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 인간화 항체는 인간 IgG 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능이 바람직할 경우, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 인간 IgG3 중쇄 불변 영역을 포함하는 비푸코실화된 인간화 항-FGFR2IIIb 항체가 선택된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 인간화 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 인간화 항체는 N297이 푸코실화되지 않은 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 인간 항체는 인간 IgG1 불변 영역 및 인간 κ 경쇄를 포함한다.

[0144] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항체는 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 3의 아미노

산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 인간화 항체는 서열 2의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄, 및 임의의 번역후 개질, 및 서열 3의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄, 및 임의의 번역후 개질을 포함한다.

[0145] **예시적인 항체 불변 영역**

[0146] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항체는 하나 이상의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgA, IgG 및 IgD로부터 선택되는 이소형의 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 경쇄 불변 영역은 κ 및 λ 로부터 선택되는 이소형의 것이다.

[0147] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항체는 인간 IgG 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능이 바람직할 경우, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 인간 IgG3 중쇄 불변 영역을 포함하는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 선택된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항체는 N297이 푸코실화되지 않은 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비푸코실화된 항체는 인간 IgG1 불변 영역 및 인간 κ 경쇄를 포함한다.

[0148] 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, 명백하게 언급되거나 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되지 않는다면, 이류노글로불린 중쇄에서 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서와 같은 EU 인덱스의 것이며, 이 문헌은 명백하게 본원에 참고로 도입된다. "카바트 (Kabat)에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0149] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 IgG 또는 야생형 항체의 Fc 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 야생형 항체의 Fc 영역에 2개 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 특정 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 야생형 항체의 Fc 영역에 3개 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 특정 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 본원에 기재된 적어도 1개, 2개 또는 3개 이상의 Fc 영역 아미노산 치환을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본원의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 항체의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성을 가질 것이다. 특정 실시양태에서, 본원의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 항체의 Fc 영역과 적어도 약 90% 상동성을 가질 것이다. 특정 실시양태에서, 본원의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 항체의 Fc 영역과 적어도 약 95% 상동성을 가질 것이다.

[0150] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에의 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0151] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 그에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성되는 천연 항체는 전형적으로 일반적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-연결에 의해 부착된 분지형 이중안테나성 올리고당류를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고당류는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산, 뿐만 아니라 이중안테나성 올리고당류 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체에서 올리고당류의 개질은 특정 개선된 특성을 갖는 항체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.

[0152] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결핍된 탄수화물 구조를 갖는 항체 (즉, 비푸코실화된 항체)가 제공된다. 예를 들어, 복수의 이러한 항체를 포함하는 조성물 중의 푸코스의 양은 0% 내지 약 5%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 이러한 항체를 포함하는 조성물은 적어도 95% 비푸코실화된 항체를 포함한다. 푸코스의 양은 Asn297에 부착된 모든 글리코구조 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고 만노스 구조)의 합에 비해, Asn297에서의 당 쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 측정된다. 항체 중의 푸코스를 검출하는 비제한적인 예시적 방법으로는 MALDI-TOF 질량 분광법 (예를 들어, WO 2008/077546 참조), 방출된 형광 표지된 올리고당류의 HPLC 측정 (예를 들어, 문헌 [Schneider *et al.*, "N-Glycan analysis of monoclonal antibodies and other glycoproteins using UHPLC with fluorescence detection," Agilent Technologies, Inc. (2012)]; [Lines, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 14: 601-608 (1996)]; [Takahashi, *J. Chrom.*, 720: 217-225 (1996)] 참조), 방출된 형광 표지된 올리고당류의 모세관 전기영동 측정 (예를 들어, 문헌 [Ma *et al.*, *Anal. Chem.*, 71: 5185-5192 (1999)] 참조), 및 단당류 조성물에 대한 펄싱된 전류측정 검출을 사용한 HPLC (예를 들어, 문헌 [Hardy, *et al.*, *Analytical Biochem.*, 170: 54-62 (1988)] 참조)를 들 수

있다. Asn297은 Fc 영역의 대략 위치 297 (Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체의 소수 서열 변이로 인해, 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294 내지 300에 위치할 수 있다. 본원에 기재된 항체 α FGFR2b에서, Asn297은 서열 QYNST에서 발견되며, 하기 나타낸 서열표, 서열 2에서 볼드체 및 밑줄로 표시된다. 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제US 2003/0157108호 (프레스타, 엘. (Presta, L.)); US 2004/0093621호 (교와 핫코 고교 컴퍼니., 리미티드 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.))를 참조한다. "비푸코실화된" 또는 "푸코스-결핍성" 항체에 관한 간행물의 예로는 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)]을 들 수 있다. 비푸코실화된 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)); 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1 호, 프레스타, 엘; 및 WO 2004/056312 A1, 아담스 (Adams) 등, 특허 실시예 11), 및 넉아웃 세포주, 예컨대 기능적 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8이 결핍된 세포주, 예를 들어 넉아웃 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 들 수 있다.

[0153] 또한, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나성 올리고당류가 GlcNAc에 의해 이등분된 이등분 올리고당류를 갖는 항체가 제공된다. 이러한 항체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체의 예는 예를 들어 WO 2003/011878 (장-마이레트 (Jean-Mairet) 등); 미국 특허 제6,602,684호 (우마나 (Umana) 등; 및 US 2005/0123546 (우마나 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당류에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 또한 제공된다. 이러한 항체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 WO 1997/30087 (파텔 (Patel) 등); WO 1998/58964 (라주, 에스. (Raju, S.)); 및 WO 1999/22764 (라주, 에스.)에 기재되어 있다.

[0154] 또한, 아미노-말단 리더 연장을 갖는 항체가 제공된다. 예를 들어, 아미노-말단 리더 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기는 항체의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단에 존재한다. 예시적인 아미노-말단 리더 연장은 항체의 하나 또는 둘 다의 경쇄에 존재하는 3개의 아미노산 잔기, VHS를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0155] 인간 FcRn 고 친화도 결합 폴리펩티드의 생체내 또는 혈청 반감기는 예를 들어 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드가 투여되는 트랜스제닉 마우스, 인간 또는 비-인간 영장류에서 분석될 수 있다. 또한, 예를 들어, 문헌 [Petkova *et al.* *International Immunology* 18(12):1759-1769 (2006)]을 참조한다.

[0156] 본 발명의 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항체는 인간 이펙터 세포의 존재 하에서 푸코스를 포함하는 모 항체보다 더 효과적으로 ADCC를 매개한다. 일반적으로, ADCC 활성은 본원에서 논의된 바와 같은 시험관내 ADCC 어세이를 사용하여 측정될 수 있지만, 예를 들어 동물 모델 등에서 ADCC 활성을 측정하는 다른 어세이 또는 방법이 고려된다.

[0157] 특정 실시양태에서, 항체의 " K_D ," " K_d ," " K_d " 또는 " K_d 값"은 25°C에서 고정화된 항원 CM5 칩으로 약 10 반응 단위 (RU)에서 비아코어 (BIACORE)[®]-2000 또는 비아코어[®]-3000 (비아코어, 인코포레이티드 (BIAcore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스캐터웨이)을 사용한 표면 플라즈몬 공명 어세이를 사용함으로써 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인코포레이티드)을 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 공급자의 지시서에 따라 활성화시킨다. 항원을 5 μ L/분의 유속으로 주입하기 전 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)으로 5 μ g/ml (약 0.2 μ M)로 희석하여 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성한다. 항원의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 비반응된 기를 블로킹한다. 동력학 측정을 위해, 폴리펩티드, 예를 들어 전장 항체의 일련의 희석액을 0.05% 트윈 (TWEEN)-20[™] 상청액을 갖는 PBS (PBST)에 25°C에서 대략 25 μ L/분의 유속으로 주입한다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 간단한 일-대-일 랑뮤어 (Langmuir) 결합 모델 (비아코어[®] 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅함으로써 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)를 비율 k_{off}/k_{on} 으로서 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면 플라

스몬 공명 어세이에 의해 온-레이트가 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우, 온-레이트는 분광광도계, 예컨대 스탑-플로우가 구비된 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠 (Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도계 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정된 바와 같은 항원의 증가하는 농도의 존재 하에서, 25℃에서 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체의 형광 방출 광도 (여기=295 nm; 방출=340 nm, 16 nm 밴드-패스)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용함으로써 측정될 수 있다.

[0158] 항체의 "온-레이트", "회합의 속도", "회합 속도" 또는 " k_{on} "은 또한 비아코어®-2000 또는 비아코어®-3000 시스템 (비아코어, 인코포레이티드, 미국 뉴저지주 피스캐터웨이)을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0159] 특정 실시양태에서, 상기 2개의 값 (예를 들어, K_d 값) 사이의 차이는 참조물/비교물 값의 함수와 실질적으로 동일하며, 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만 및/또는 약 10% 미만이다.

[0160] 특정 실시양태에서, 상기 2개의 값 (예를 들어, K_d 값) 사이의 차이는 참조물/비교물 분자에 대한 값의 함수와 실질적으로 상이하며, 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과 및/또는 약 50% 초과이다.

[0161] **예시적인 리더 서열**

[0162] 일부 분비된 단백질이 대량으로 발현 및 분비되도록 하기 위해, 이중성 단백질로부터의 리더 서열이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중성 리더 서열의 채용은 생성되는 성숙 폴리펩티드가 리더 서열이 분비 공정 동안 ER에서 제거될 때 변경되지 않고 잔류할 수 있다는 점에서 유리할 수 있다. 이중성 리더 서열의 첨가는 일부 단백질을 발현 및 분비하는 데 요구될 수 있다.

[0163] 특정 예시적인 리더 서열 서열은 예를 들어 국립 싱가포르 대학교 생화학부에 의해 유지되는 온라인 리더 서열 데이터베이스에 기재되어 있다. 문헌 [Choo *et al.*, *BMC Bioinformatics*, 6: 249 (2005)]; 및 PCT 공개 제WO 2006/081430호를 참조한다.

[0164] **III. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 특성**

[0165] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 시험관내에서 및/또는 생체내에서 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 시험관내에서 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 시험관내 ADCC 활성은 본원에, 예를 들어 실시예 3에 기재된 방법에 의해 측정된다. 간략하게, FGFR2IIIb-발현 세포를 25:1 이펙터 (PBMC) 대 표적 세포의 비율로, 푸코실화된 항체 또는 비푸코실화된 항체의 존재 하에서 신선하게 단리된 인간 PBMC와 접촉시킨다. 일부 실시양태에서, FGFR2IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포가 표적 세포로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포독성은 사이토독스 비-방사성 세포독성 어세이 (CytoTox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) (프로메가 (Promega), 미국 위스콘신주 매디슨)를 사용하여 LDH 방출을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 최대 용해는 5% 트리톤 (Triton) X-100을 사용하여 측정되고, 자발적 방출은 항체의 부재 하에서 측정된다. 일부 실시양태에서, 비 용해의 퍼센트는 식: (실험적 - 자발적 방출) / (최대 - 자발적 방출) x 100 = % 비 용해를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 향상된 ADCC 활성을 갖는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 시험된 항체의 적어도 하나의 농도에서 푸코실화된 항체의 동일한 양으로의 비 용해보다 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70 또는 적어도 75 퍼센트 포인트 더 큰 비 용해를 초래한다. 일부 실시양태에서, 향상된 ADCC 활성을 갖는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항체로의 비 용해보다 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70 또는 적어도 75 퍼센트 포인트 더 큰 비 용해를 초래하며, 각각의 항체는 0.01 내지 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도이고, 표적 세포는 FGFR2IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포이다. 일부 실시양태에서, 항체는 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 또는 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 시험된다.

[0166] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 향상된 Fc 감마 RIIIA(F158)에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 감마 RIIIA에 대한 항체 친화도는 예를 들어 본원의 실시예 2에 기재된 바와 같이 및/또는 하기와 같이, Fc 감마 RIIIA(V158)에 관해 기재된, 그러나 또한 Fc 감마 RIIIA(F158)에 대한 친화도를 측정하는

데 적합한 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 측정된다. 간략하게, 일부 실시양태에서, 푸코실화된 또는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 단백질 A-코팅된 텍스트란 칩 상에 포획한다. Fc 감마 RIIIA (V158) (예를 들어, 알앤디 시스템즈 (R&D Systems)에서 시판됨)를 다양한 농도에서 주입한다. 푸코실화된 및 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체에 대한 회합 상수, 해리 상수, 및 Fc 감마 RIIIA (V158)의 친화도를 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 시스템이 제공된 소프트웨어 (예를 들어, 비아코어 T200 평가 소프트웨어 1:1 결합 모델)를 사용하여 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 향상된 Fc 감마 RIIIA (예컨대 Fc 감마 RIIIA(V158) 또는 Fc 감마 RIIIA(F158))에 대한 친화도를 갖는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체보다 적어도 2-배, 적어도 3-배, 적어도 4-배, 적어도 5-배, 적어도 7-배, 적어도 10-배, 적어도 12-배, 적어도 15-배, 적어도 17-배 또는 적어도 20-배 더 큰 친화도로 Fc 감마 RIIIA에 결합한다. 예를 들어, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 9.2 nM의 친화도 (K_D)로 Fc 감마 RIIIA (V158)에 결합하고, 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체가 207 nM의 친화도 (K_D)로 Fc 감마 RIIIA (V158)에 결합할 경우, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체보다 $207/9.2=22.5$ -배 더 큰 친화도로 Fc 감마 RIIIA (V158)에 결합한다.

[0167] IV. 항-FGFR2IIIb 항체 발현 및 생성

[0168] 항-FGFR2IIIb 항체를 코딩하는 핵산 분자

[0169] 항-FGFR2IIIb 항체의 하나 이상의쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자가 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 항-FGFR2IIIb 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 항-FGFR2IIIb 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 분자는 중쇄를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 제2 핵산 분자는 경쇄를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0170] 일부 이러한 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 하나의 핵산 분자로부터, 또는 2개의 별개의 폴리펩티드로서의 2개의 별개의 핵산 분자로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, 항체가 scFv인 경우와 같이, 단일 폴리뉴클레오티드는 함께 연결된 중쇄 및 경쇄 둘 다를 포함하는 단일 폴리펩티드를 코딩한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 항-FGFR2IIIb 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 번역될 경우 중쇄 또는 경쇄의 N 말단에 위치하는 리더 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 논의된 바와 같이, 리더 서열은 천연 중쇄 또는 경쇄 리더 서열일 수 있거나, 또다른 이중성 리더 서열일 수 있다.

[0172] 핵산 분자는 관련 기술분야에서 통상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 선택된 숙주 세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터이다.

[0173] 벡터

[0174] 항-FGFR2IIIb 중쇄 및/또는 항-FGFR2IIIb 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 항-FGFR2IIIb 중쇄 및/또는 항-FGFR2IIIb 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 이러한 벡터로는 DNA 벡터, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 벡터는 중쇄를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열 및 경쇄를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 2개의 별개의 폴리펩티드로서 벡터로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 예를 들어 항체가 scFv인 경우와 같이 단일 폴리펩티드의 일부로서 발현된다.

[0175] 일부 실시양태에서, 제1 벡터는 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 제2 벡터는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 벡터 및 제2 벡터는 유사한 양 (예컨대 유사한 몰량 또는 유사한 질량)으로 숙주 세포 내로 형질감염된다. 일부 실시양태에서, 5:1 내지 1:5의 몰- 또는 질량-비율의 제1 벡터 및 제2 벡터가 숙주 세포 내로 형질감염된다. 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 벡터 및 경쇄를 코딩하는 벡터에 대해 1:1 내지 1:5의 질량 비율이 사용된다. 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 벡터 및 경쇄를 코딩하는 벡터에 대해 1:2의 질량 비율이 사용된다.

[0176] 일부 실시양태에서, CHO 또는 CHO-유래된 세포에서, 또는 NSO 세포에서 폴리펩티드의 발현에 최적화된 벡터가 선택된다. 예시적인 이러한 벡터는 예를 들어 문헌 [Running Deer *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004)]에 기재되어 있다.

[0177] 숙주 세포

- [0178] 다양한 실시양태에서, 항-FGFR2IIIb 중쇄 및/또는 항-FGFR2IIIb 경쇄는 원핵세포, 예컨대 박테리아 세포에서; 또는 진핵 세포, 예컨대 진균 세포 (예컨대 효모), 식물 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 발현은 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 절차에 따라 수행될 수 있다. 폴리펩티드를 발현하는데 사용될 수 있는 예시적인 진핵 세포로는 COS 세포, 예컨대 COS 7 세포; 293 세포, 예컨대 293-6E 세포; CHO 세포, 예컨대 CHO-S, DG44, Lec13 CHO 세포, 및 FUT8 CHO 세포; PER.C6[®] 세포 (크루셀); 및 NSO 세포를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR2IIIb 중쇄 및/또는 항-FGFR2IIIb 경쇄는 효모에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 제US 2006/0270045 A1호를 참조한다. 일부 실시양태에서, 특정 진핵 숙주 세포는 항-FGFR2IIIb 중쇄 및/또는 항-FGFR2IIIb 경쇄에 바람직한 번역후 개질을 형성하는 그의 능력에 기재하여 선택된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, CHO 세포는 293 세포에서 생성되는 동일한 폴리펩티드보다 더 높은 수준의 시알틸화를 갖는 폴리펩티드를 생성한다.
- [0179] 바람직한 숙주 세포 내로의 하나 이상의 핵산의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개된 형질감염, 양이온성 지질-매개된 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 비제한적인 예시적 방법은 예를 들어 문헌 [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)]에 기재되어 있다. 핵산은 임의의 적합한 방법에 따라 바람직한 숙주 세포에 일시적으로 또는 안정하게 형질감염될 수 있다.
- [0180] 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 비푸코실화된 항체를 생성할 수 있는 세포, 예컨대 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); 미국 특허 공개 제US 2003/0157108 A1호, 프레스타, 엘; 및 WO 2004/056312 A1, 아담스 등, 특히 실시예 11), 및 넥아웃 세포주, 예컨대 기능적 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8이 결핍된 세포주, 예를 들어 넥아웃 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)에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 기능적 FUT8 유전자가 결핍된 CHO 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 포텔리전트 (Potelligent)[®] CHOK1SV 세포 (바이오와/론자 (BioWa/Lonza), 미국 뉴저지주 알렌데일)에서 생성된다.
- [0181] **항-FGFR2IIIb 항체의 정제**
- [0182] 항-FGFR2IIIb 항체는 임의의 적합한 방법에 의해 정제될 수 있다. 이러한 방법으로는 친화도 매트릭스 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피의 사용을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 적합한 친화도 리간드로는 FGFR2IIIb ECD 및 항체 불변 영역에 결합하는 리간드를 들 수 있다. 예를 들어, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 또는 항체 친화도 컬럼은 불변 영역에 결합하고, 항-FGFR2IIIb 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다. 소수성 상호작용 크로마토그래피, 예를 들어 부틸 또는 페닐 컬럼은 또한 일부 폴리펩티드를 정제하는 데 적합할 수 있다. 폴리펩티드를 정제하는 많은 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0183] **항-FGFR2IIIb 항체의 무세포 생성**
- [0184] 일부 실시양태에서, 항-FGFR2IIIb 항체는 무세포 시스템에서 생성된다. 비제한적인 예시적 무세포 시스템은 예를 들어 문헌 [Sitaraman *et al., Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009)]; [Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004)]; [Endo *et al., Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)]에 기재되어 있다.
- [0185] **V. 치료 조성물 및 방법**
- [0186] **항-FGFR2IIIb 항체를 사용한 질환의 치료 방법**
- [0187] 인간 또는 동물에 대한 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 항체, 및 본 발명의 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료 방법이 또한 제공된다. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체로 치료될 수 있는 비제한적인 예시적 질환으로는 암을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 또는 식도암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 투여하는 것을 포함하는 위암의 치료 방법이 제공된다.
- [0188] 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 유전자 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로

FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 위암은 FGFR2 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 유전자 증폭을 포함하는 위암은 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 위암은 FGFR2IIIc보다 더 큰 정도로 FGFR2IIIb를 과발현한다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭을 포함하는 위암은 FGFR2IIIc 발현의 정규화된 수준보다 2-배, 3-배, 5-배 또는 10-배 초과로 더 큰 정규화된 수준으로 FGFR2IIIb를 발현한다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 GUSB에 대해 정규화된다. 일부 실시양태에서, 위암은 FGFR2IIIb를 과발현하지만, FGFR2 유전자 증폭을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 과발현은 mRNA 과발현이다. 일부 실시양태에서, 과발현은 단백질 과발현이다.

[0189] FGFR2IIIb 유전자 증폭은 계내 혼성화 (ISH)를 포함하나 이에 제한되지 않는 관련 기술분야의 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, FGFR2 증폭은 3 초과 FGFR2:CEN10 (염색체 10 동원체) 비율을 포함한다.

[0190] FGFR2IIIb mRNA 과발현은 정량적 PCR (qPCR)을 포함하는 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 관련 기술분야의 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 용어 "FGFR2IIIb mRNA 과발현"은 상승된 수준의 원인 (즉, 상승된 수준이 mRNA의 증가된 전사 및/또는 감소된 분해, 다른 메커니즘, 또는 메커니즘의 조합인지)에 무관하게 FGFR2IIIb mRNA의 이러한 상승된 수준을 의미한다.

[0191] FGFR2IIIb 단백질 과발현은 면역조직화학 (IHC)과 같은 항체-기재 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 관련 기술분야의 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, IHC 염색은 관련 기술분야의 방법에 따라 점수화된다. 용어 "FGFR2IIIb 단백질 과발현"은 상승된 수준의 원인 (즉, 상승된 수준이 단백질의 증가된 전사 및/또는 감소된 분해, 다른 메커니즘, 또는 메커니즘의 조합인지)에 무관하게 FGFR2IIIb 단백질의 이러한 상승된 수준을 의미한다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 1+, 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC에 의한 종양 세포의 2+ 또는 3+ 염색은 FGFR2IIIb 과발현을 지시한다. 일부 실시양태에서, IHC 염색은 실시예 6에 기재된 바와 같이 점수화된다.

[0192] 제약 조성물

[0193] 다양한 실시양태에서, 폭넓게 다양한 제약학적으로 허용되는 담체를 갖는 제제 중에 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하는 조성물이 제공된다 (예를 들어, 문헌 [Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)]; [Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)]; [Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조). 비히클, 아주 반트 및 희석제를 포함하는 다양한 제약학적으로 허용되는 담체가 이용가능하다. 더욱이, 다양한 제약학적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 긴장성 조정제, 안정화제, 습윤화제 등이 또한 이용가능하다. 비제한적인 예시적 담체로는 염수, 완충 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 들 수 있다.

[0194] 다양한 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하는 조성물은 이를 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 식물성 또는 다른 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르, 또는 프로필렌 글리콜을, 바람직할 경우 통상적인 첨가제, 예컨대 가용화제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 함께 용해, 현탁 또는 에멀전화함으로써, 피하 투여를 포함하여 주사용으로 제제화될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 조성물은 예를 들어 가압된 허용되는 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등을 사용하여 흡입용으로 제제화될 수 있다. 조성물은 또한 다양한 실시양태에서 서방형 마이크로캡슐로, 예컨대 생체분해성 또는 비-생체분해성 중합체로 제제화될 수 있다. 비제한적인 예시적 생체분해성 제제로는 폴리 락트산-글리콜산 중합체를 들 수 있다. 비제한적인 예시적 비-생체분해성 제제로는 폴리글리세린 지방산 에스테르를 들 수 있다. 이러한 제제를 제조하는 특정 방법은 예를 들어 EP 1 125 584 A1에 기재되어 있다.

[0195] 투여 경로

[0196] 다양한 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 경구, 동맥내, 비경구, 비강내, 근육내, 심장내, 심실내, 기관내, 협측, 직장, 복강내, 피내, 국소, 경피 및 척추강내, 또는 다르게는 이식 또는 흡입에 의해서를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 경로에 의해 생체내로 투여될 수 있다. 대상 조성물은 정제, 캡슐제, 분말

제, 과립제, 연고, 용액제, 좌제, 관장제, 주사제, 흡입제 및 에어로졸제를 포함하나 이에 제한되지 않는 고체, 반-고체, 액체 또는 기체 형태의 제제로 제제화될 수 있다. 적절한 제제 및 투여 경로는 의도되는 적용에 따라 선택될 수 있다.

[0197] 제약 조성물은 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 또는 식도암과 같은 암의 치료 또는 예방에 유용한 양으로 투여된다. 치료적 유효량은 전형적으로 치료되는 대상체의 체중, 그 또는 그녀의 신체적 또는 건강 상태, 치료되어야 할 상태의 범위, 또는 치료되는 대상체의 연령에 의존한다. 일반적으로, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 용량 당 약 10 µg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중의 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 용량 당 약 50 µg/kg 체중 내지 약 5 mg/kg 체중의 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR2IIIb 항체는 용량 당 약 100 µg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중의 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 용량 당 약 100 µg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중의 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 용량 당 약 0.5 mg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중의 범위의 양으로 투여될 수 있다.

[0198] 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체 조성물은 대상체에 필요한 대로 투여될 수 있다. 투여 빈도의 결정은 관련 기술분야의 통상의 기술자, 예컨대 치료되는 상태, 치료되는 대상체의 연령, 치료되는 상태의 중증도, 치료되는 대상체의 건강의 일반적 상태 등의 고려에 기재한 주치의에 의해 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 유효 용량은 하나 이상의 횟수로 대상체에게 투여된다. 다양한 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 유효 용량은 1개월에 1회, 1개월에 1회 초과, 예컨대 2개월에 1회 또는 3개월에 1회로 대상체에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 유효 용량은 1달에 1회 미만, 예컨대 2주에 1회 또는 1주에 1회 투여된다. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 유효 용량은 적어도 1회 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 유효 용량은 적어도 1개월, 적어도 6개월 또는 적어도 1년의 기간 동안을 포함하여 다중 횟수로 투여될 수 있다.

[0199] 조합 요법

[0200] 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 단독으로 또는 다른 치료 방식과 함께 투여될 수 있다. 이는 다른 치료 방식, 예를 들어 수술, 화학요법 또는 방사선 요법 전에, 실질적으로 동시에, 또는 후에 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 또다른 항암제와 함께 투여된다. 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체와 함께 투여될 수 있는 비제한적인 예시적 항암제의 예로는 백금 제제 (예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴), 파클리탁셀 (탁솔 (TAXOL)®), 파클리탁셀의 알부민-유전자조작된 나노입자 제제 (아브락산®), 도세탁셀 (탁소테레 (TAXOTERE)®), 겐시타빈 (겐자르 (GEMZAR)®), 카페시타빈 (젤로다 (XELODA)®), 이리노테칸 (캄프토사르 (CAMPTOSAR)®), 에피루비신 (엘렌스 (ELLENCE)®), 파모루비신 (PHARMORUBICIN)®, 폴폭스 (5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴), 폴피리 (류코보린, 5-FU 및 이리노테칸의 조합), 류코보린, 플루오로우라실 (5-FU, 에푸덱스 (EFUDEX)®), 미토마이신 C (미토지트렉스 (MITOZYTREX)™, 무타마이신 (MUTAMYCIN)®) 및 독소루비신 히드로클로라이드 (아드리아마이신 (Adriamycin) PFS, 아드리아마이신 RDF, 루벡스 (RUBEX)®)를 들 수 있다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 파클리탁셀과 함께 투여된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 시스플라틴 및/또는 5-FU와 함께 투여된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 시스플라틴 및 5-FU와 함께 투여된다. 일부 실시양태에서, 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체는 폴폭스 (옥살리플라틴, 5-FU 및 류코보린)와 함께 투여된다.

[0201] 키트/제조품

[0202] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 방법에 사용하기 위한 키트, 의약, 조성물 및 단위 투여 형태를 제공한다.

[0203] 본 발명의 키트는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하는 하나 이상의 용기 (또는 단위 투여 형태 및/또는 제조품)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 제제를 갖거나 갖지 않는 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체를 포함하는 조성물의 미리 결정된 양을 함유하는 단위 투여량이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 단위 투여량은 주사용 단일-사용 예비충진된 시린지로 공급된다. 다양한 실시양태에서, 단위 투여량에 함유된 조성물은 염수, 수크로스 등; 완충액, 예컨대 인산염 등을 포함할 수 있고/거나 안정한 및 유효한 pH 범위 내로 제제화될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 조성물은 적절한 액체, 예를 들어 멸균수의 첨가 시 재구성될 수 있는 동결건조된 분말로서 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 수크로스 및 아르기닌을 포함하나 이에 제한되지 않는 단백질 응집을 억제하는 1종 이상의 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및/또는 프로테오글리칸을 포함한다.

- [0204] 일부 실시양태에서, 본 발명의 키트는 본원에 기재된 임의의 방법에 따른 예를 들어 암 (예컨대 위암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암 또는 식도암)의 치료에 사용하기 위한 지시서를 더 포함한다. 키트는 적합한 개체 또는 치료의 선택의 설명을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 키트에 공급된 지시서는 전형적으로 라벨 또는 패키지 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상에 쓰여진 지시서이지만, 기계-판독가능한 지시서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크에 담긴 지시서)도 또한 허용가능하다. 일부 실시양태에서, 키트는 또다른 치료제를 더 포함한다.
- [0205] 본 발명의 키트는 적합한 패키지에 있다. 적합한 패키지로는 바이알, 병, 단지, 가요성 패키지 (예를 들어, 밀봉된 마일러 (Mylar) 또는 플라스틱 백) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 키트는 임의로 완충제 및 해석적 정보와 같은 추가의 성분을 제공할 수 있다. 따라서, 본 출원은 또한 바이알 (예컨대 밀봉된 바이알), 병, 단지, 가요성 패키지 등을 포함하는 제조품을 제공한다.
- [0206] **실시예**
- [0207] 하기 논의된 실시예는 본 발명의 순수하게 예시적인 것으로 의도되며, 본 발명을 어떤 식으로도 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 실시예는 하기 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험임을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 수 (예를 들어, 양, 온도 등)에 관한 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어져야 하지만, 일부 실험적 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는다면, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 도이고, 압력은 대기압 또는 거의 대기압이다.
- [0208] **실시예 1: 비푸코실화된 항-FGFR2IIIb 항체의 생성.**
- [0209] **발현 벡터의 구축.** 모노클로날 항체 α FGFR2b의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 GS 유전자 발현 시스템 (론자 (Lonza), 스위스 바젤) 내로 제조자의 지시서에 따라 클로닝하였다. 시스템은 경쇄 및 중쇄 둘 다에 대한 발현 카세트를 함유하는 이중 유전자 벡터 (DGV)를 생성한다.
- [0210] **숙주 세포주의 선택.** 비푸코실화된 모노클로날 항체 α FGFR2bA (α FGFR2b 뒤의 표시 "A"는 "비푸코실화된"을 지칭함)를 생성하기 위해, 포텔리전트® CHOK1SV 세포 (바이오와/론자, 미국 뉴저지주 알렌데일)를 숙주 세포주로서 선택하였다. 포텔리전트® CHOK1SV 세포는 *FUT8* 유전자 (α 1,6-푸코실트랜스퍼라제)가 결핍되어 있으며, 따라서, 푸코스-무함유 항체 (비푸코실화된 항체)를 생성한다.
- [0211] **비푸코실화된 α FGFR2bA 항체의 생성을 위한 안정한 세포주의 구축:** 상기 기재된 α FGFR2b 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포텔리전트® CHOK1SV 세포 내로 전기천공에 의해 제조자의 지시서에 따라 형질감염시켰다. 전기천공된 세포를 L-글루타민이 없는 CD CHO 배지에서 96-웰 플레이트 내로 약 10,000 세포/50 μ l/웰로 시딩하였다. 67 μ M L-메티오닌 술폭시민 (MSX, 시그마 (SIGMA) cat#M5379, 미국 미주리주 세인트 루이스)을 함유하는 선택적 CD CHO 배지를 다음날 150 μ l/웰로 첨가하였다. 세포 성장 및 클론 형성을 인 셀 어널라이저 (IN Cell Analyzer) 2000 (지이 헬스케어 (GE Healthcare), 미국 뉴저지주 피스캐터웨이)으로 모니터링하였다.
- [0212] 4 내지 6주 후, 생존한 콜로니를 XL665 컨주게이션된 단백질 A 및 크립테이트 컨주게이션된 폴리클로날 토끼 IgG (시스바이오 (Cisbio), 미국 메사추세츠주 베드포드)를 사용하여, 정제된 α FGFR2b 항체로 생성된 표준 곡선에 대한 상동성 시간 분석 형광 (Homogenous Time Resolved Fluorescence; HTRF) 기계 어세이를 사용하여 α FGFR2bA 항체의 발현에 대해 스크리닝하였다. 가장 높게 발현하는 콜로니를 24-웰 플레이트, 스핀 튜브, 진탕 플라스크, 벤치 스케일 생물반응기를 포함하는 일련의 증가-스케일 생성 공정, 및 최종적으로 플랫폼 생성 공정을 통해 확대하였다. 각각의 단계에서, 가장 높은-발현 클론을 포함하는 하위집합만을 다음 공정에 대해 취하였다. 최종 생성 클론을 단백질 생성물 역가, 세포 성장 특징, 생성물 품질, 안정성, 뿐만 아니라 생물반응기에서의 확장성의 평가에 기재하여 선택하였다. 최종 생성 주는 α FGFR2bA에 대해 약 3.5 g/L의 발현 수준을 가졌다. 최종 생성 세포주에서 생성된 α FGFR2bA에서의 푸코실화의 결핍을 정상 상 HPLC (N-HPLC) 크로마토그래피를 사용하여 확인하였다.
- [0213] α FGFR2bA 항체를 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하고, 정제된 물질을 한외여과하여 농축시킨 후, 투석여과하여 제제 완충액 (20 mM 히스티딘, 150 mM L-아르기닌, 0.01% 폴리소르베이트 20, pH 6.0)으로 교환하였다. 항체를 -70°C 미만에서 저장하였다.
- [0214] 글리칸을 단백질로부터 방출시키고, 글리칸을 안트라닐산 (2-AA)으로 표지한 후, 표지된 글리칸을 정제함으로써 α FGFR2bA의 글리칸 분석을 수행하였다. 형광 검출을 사용한 정상 상 HPLC를 사용하여 글리칸을 분리하고, 항

체 중의 각각의 글리칸의 상대적 양을 측정하였다. 도 7은 포텔리전트® CHOK1SV 세포주로부터 유래된 α FGFR2b 및 CHOK1SV로부터 생성된 α FGFR2b가 2가지 상이한 글리칸 분포를 가졌음을 나타낸다. (A) 포텔리전트® CHOK1SV 세포주로부터 유래된 α FGFR2b의 글리칸 분포는 항체가 푸코스가 결핍되어 있음을 나타낸다 ("G0"). (B) CHOK1SV 세포주로부터 유래된 α FGFR2b의 글리칸 분포는 항체가 푸코스를 함유함을 나타낸다 ("G0F").

[0215] 정상 상 HPLC 분리로부터의 글리칸 피크를 2가지 직교 방법을 사용하여 확인하였다. 먼저, 포텔리전트® CHOK1SV 생성된 α FGFR2b를 표지하고, 정상 상 HPLC 방법을 사용하여 분리하였다. 형광 검출 후, 글리칸을 QTrap 질량 분광광도계를 통해 통과시켰다. 각각의 피크의 질량을 측정하고, 각각의 글리칸을 양성적으로 확인하는 데 사용하였으며, 표 2에 나타낸다.

[0216] <표 2> 글리칸 피크의 질량

글리칸	이론적 질량 (Da)	관측된 질량 (Da)
G0	1437	1437.4
Man-5	1355	1355.3
G1	1600	1599.4

[0217]

[0218] 글리칸의 각각의 푸코실화된 형태 (G0F, G1F 및 G2F)의 질량을 또한 포텔리전트® CHOK1SV 생성된 α FGFR2b에서 조사하였으며, 관측되지 않았다. 도 8은 항체에서 전형적으로 관측되는 G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F 및 만노스-5 (또는 Man-5) 글리칸 구조의 개략적 도해를 나타낸다.

[0219] HPLC 어세이로부터의 피크 확인을 또한 프로자임 (Prozyme)으로부터 구입한 글리칸 표준물을 사용하고, 표준물 및 포텔리전트® CHOK1SV 세포주 및 CHOK1SV 세포주 둘 다로부터의 α FGFR2 프로파일 사이의 체류 시간을 매칭시켜 확인하였다. 이들 표준물은 G0, G0F, Man5, G1, G1F 및 G2F를 확인할 수 있었다.

[0220] HPLC 어세이 뿐만 아니라 특성화 데이터로부터의 결과는 포텔리전트® CHOK1SV 세포주로부터 유래된 α FGFR2에 서의 푸코실화의 결핍을 확인시켜 주었다.

[0221] 실시예 2: 비푸코실화된 항-FGFR2b 항체 결합 친화도.

[0222] Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 α FGFR2bA 및 α FGFR2bF (α FGFR2b 뒤의 표시 "F"는 "푸코실화된"을 지칭함)의 결합 친화도를 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정하였다. 간략하게, 단백질 A를 아민 커플링 키트 (Amine Coupling Kit) (GE 헬스케어 라이프 사이언시즈 (GE Healthcare Life Sciences), 미국 뉴저지주 피스캐터웨이) 및 블로킹 시약으로서 100 mM 붕산나트륨 완충액 (pH 8.0) (시그마 (Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스) 중 100 mM 에틸렌디아민 (시그마)을 사용하여 텍스트란 칩에 공유 부착시켰다. 대략 600 내지 800 RU의 α FGFR2bA 및 α FGFR2bF를 별개의 유동 세포 상에 포획하였으며, 단백질 A (피어스 (Pierce)) 유도체화된 유동 세포는 참조 대조군으로서 기능하였다. Fc 감마 RIIIA (V158) (알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 미네아폴리스)를 HBS-P+ 구동 완충액 (비아코어, 지이 헬스케어, 미국 뉴저지주 피스캐터웨이)에 희석하고, 5가지 농도 (0 nM, 12.3 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM 및 1000 nM)로 이중으로 주입하였다. α FGFR2bA에 대한 회합 상수, 해리 상수 및 친화도를 비아코어 T200 평가 소프트웨어 1:1 결합 모델을 사용하여 계산하였다. α FGFR2bF 결합에 대한 친화도 상수를 비아코어 T200 평가 소프트웨어 정상 상태 친화도 모델을 사용하여 측정하였다. 결과를 표 3에 나타낸다.

[0223] <표 3> Fc 감마 RIIIA(V158)에 대한 α FGFR2bA 및 α FGFR2bF 항체 친화도

α FGFR2b	$K_D (k_d/k_a)$ (nM)	k_a (1/Ms) x 10^3	k_d (1/ms)
A	9.2	940.1	8.6
F	207	--	--

[0224]

[0225] 표 3에 나타낸 바와 같이, Fc 감마 RIIIA(V158)는 α FGFR2bF에 결합하는 것보다 20배 초과로 더 큰 친화도로 α FGFR2bA에 결합하였다.

[0226] 실시예 3: 비푸코실화된 항-FGFR2b 항체 ADCC 활성.

- [0227] αFGFR2bA 항체 대 αFGFR2bF 항체의 ADCC 활성을 측정하기 위한 시험관내 어세이를 수행하였다. Ba/F3 FGFR2IIIb-발현 표적 세포를 하기와 같이 생성하였다. 라이프니츠-인스티투트 데에스엠제트-도이치 삼룽 폰 미크로오르가니즘 언트 젤쿨투렌 게엠베하 (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (DSMZ, cat# ACC300, 독일 브라운슈바이크)로부터 획득한 Ba/F3 세포를 10% 소 태아 혈청 (메디아테크 (Mediatech), cat# 35-010-CV), 1 ng/mL 류틴 IL-3 (페프로테크 (Peprotech), cat# 213-13, 미국 뉴저지주 로키 힐), 1X BME (인비트로젠 (Invitrogen), cat# 1047574, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드), 및 1X 페니실린-스트렙토마이신 (메디아테크, cat# 30-002-C1)이 보충된 RPMI (메디아테크, cat# 10-041-CV, 미국 버지니아주 마나사스)에서 유지하였다. Ba/F3 세포를 셀 라인 뉴클레오펙터 (Cell Line Nucleofector)® 키트 V (론자, cat# VCA-1003)를 제조자의 프로토콜에 따라 사용하여 FGFR2IIIb를 발현하는 발현 벡터, pBNew-hFGFR2b로 형질감염시켰다. pBNew 벡터는 닭 β-액틴 인트론을 갖는 CAG 프로모터 및 암피실린 및 푸로마이신 성장 선택 유전자를 함유한다. 형질감염된 세포를 완전 성장 배지에서 3일 동안 인큐베이션한 후, 푸로마이신 (인비보젠 (InVivoGen), cat # ant-pr-1, 미국 캘리포니아주 산 디에고) 2 μg/ml로 처리하였다. 푸로마이신 선택은 배양 전반에 걸쳐 유지되었다. 개별 안정한 클론을 생성하기 위해, 세포를 3 웰 당 1 세포의 밀도로 플레이트하였다. 항-FGFR2IIIb 항체로의 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)를 사용하여 높은 수준의 FGFR2IIIb 발현을 갖는 클론을 선택하였다.
- [0228] MFM-223 세포는 영국의 헬스 프로텍션 에이전시 (Health Protection Agency)로부터 얻었고; OCUM-2M 세포는 일본 오사카의 오사카 시티 유니버시티 (Osaka City University)로부터 얻었고; KATO III 세포는 미국 메릴랜드주 록빌의 ATCC로부터 얻었다. 모든 세포는 표준 방법을 사용하여 배양하였다. 건강한 공여자로부터 신선하게 분리된 PMBC는 미국 캘리포니아주 에머리빌의 올셀즈 (AllCells)로부터 얻었다.
- [0229] ADCC 어세이를 3일의 상이한 날에 3명의 독립적인 공여자로부터의 이펙터 세포를 사용하여 수행하였다. ADCC 어세이 시험을 이펙터 세포로서 신선하게 분리된 인간 PMBC를 25:1의 이펙터 대 표적 (E/T) 세포 비율로 사용하여 수행하였다. 표적 세포를 이펙터 및 증가하는 농도의 항체의 존재 하에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. ADCC 어세이는 2개의 양성 대조군 항체, SKOV-3 표적 세포에 대해 헤르셉틴 (HERCEPTIN)® 및 Raji 표적 세포에 대해 리툭신 (RITUXIN)®을 사용하여 입증되었다. 완전히 인간 IgG1 음성 대조군 항체 (유레카 테라퓨틱스 (Eureka Therapeutics), 카탈로그 ET901, 미국 캘리포니아주 에머리빌)를 비-특이적 세포 세포독성을 위해 사용하였다. LDH 방출을 제조자의 지시서에 따라 (사이토독스 비 방사성 세포독성 어세이, 프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨) 정량화함으로써 세포독성을 측정하였다.
- [0230] 최대 용해를 5% 트리톤 X-100의 존재 하에서 측정하고, 자발적 방출을 항체의 부재 하에서 측정하였다. 비 용해의 퍼센트를 하기와 같이 최대 용해 빼기 자발적 방출의 퍼센트로서 계산하였다:
- [0231]
$$(\text{실험적} - \text{자발적 방출}) / (\text{최대} - \text{자발적 방출}) \times 100 = \% \text{ 비 용해}$$
- [0232] Ba/F3 세포에 대한 결과를 도 1에 나타낸다. 비푸코실화된 αFGFR2bA 항체는 FGFR2IIIb-발현 Ba/F3 세포에서 푸코실화된 αFGFR2bF 항체보다 더 큰 비 용해를 유도하였다. OCUM-2M, MFM 223 및 KATO III 세포에서, αFGFR2bA는 αFGFR2bF보다 낮은 농도에서 더 큰 ADCC 활성을 나타내었지만, 항체의 최대 비 용해는 OCUM-2M 및 MFM 223 세포에서 필적할만하였다 (테이터는 도시하지 않음). 또한, αFGFR2b는 FGFR2IIIc-발현 Ba/F3 세포에서 거의 내지 전혀 ADCC 활성을 나타내지 않았다. 도 1A를 참조한다.
- [0233] **실시예 4: 위암 및 유방암 이중이식 모델에서의 비푸코실화된 항-FGFR2b 항체 활성**
- [0234] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (Charles River Laboratories) (미국 메사추세츠주 윌밍톤)로부터 구입하고, 연구 시작 전 1주 동안 순응시켰다. 인간 위 암종 세포주 OCUM-2M 또는 유방 암종 세포주 MFM-223을 중앙 모델로서 사용하였다. OCUM-2M은 퍼블릭 유니버시티 코퍼레이션 오사카 시티 유니버시티 (Public University Corporation Osaka City University) (OCU, 일본 오사카)로부터 구입하였고, MFM-223은 컬처 콜렉션즈, 퍼블릭 헬스 잉글랜드 (Culture Collections, Public Health England) (영국 살리스버리 HPA 컬처 콜렉션즈 98050130)로부터 구입하였다. 세포를 이식용으로 확대하기 위해 완전 성장 배지에서 3회 통과 이하 동안 배양하였다. OCUM-2M 및 MFM-223 세포를 각각 돌베코 최소 필수 배지 (Dulbecco's Minimum Essential Medium; DMEM) 및 최소 필수 배지 (Minimum Essential Medium; MEM)에서 배양하였다. 모든 배지는 10% 열-불활성화된 소 태아 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신 용액으로 보충되었다. 세포를 37 °C에서 5% CO₂를 갖는 습윤화된 분위기에서 성장시켰다.
- [0235] 배양된 세포가 85 내지 90% 용해에 도달하였을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭젤 (Matrigel)을 함유하는 차

가운 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 무함유 인산염 완충 염수 (PBS) (비디 바이오사이언시스 (BD BioSciences), 미국 캘리포니아 주 산 조스)에 채현탁시켰다. OCUM-2M 세포를 마우스의 우측 옆구리 상으로 5×10^5 세포/100 μl /마우스로 피하 이식하였다. MFM-223 세포를 마우스의 우측 옆구리 상으로 5×10^5 세포/100 μl /마우스로 피하 이식하고, 0.72 mg 90-일 방출 $17-\beta$ 에스트라디올 펠릿 (이노베이트리브 리서치 오브 아메리카 (Innovative Research of America), 미국 플로리다주 사라소타)을 우측 옆구리 내로 피하 접종하였다. 마우스를 세포 이식 후 종양 성장에 대해 1주에 2회 모니터링하였다. 종양 크기는 식: 종양 크기 (mm^3) = (폭 (mm) x 길이 (mm)²)/2에 따라 측정하였다. MFM-223 종양이 80 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 분류하고, 랜덤화하고 ($n=10$), 치료를 개시하였다. OCUM-2M 종양에 대해, 종양이 100 mm^3 의 평균 크기에 도달하면 항-FGFR2b를 사용한 단일 요법을 개시하고, 종양이 250 mm^3 의 평균 크기에 도달하면 조합 요법을 개시하였다.

[0236] 항-FGFR2IIIb 인간화 항체 (비푸코실화된, $\alpha\text{FGFR2bA}$; 푸코실화된, $\alpha\text{FGFR2bF}$) 또는 음성 대조군으로서 알부민을 도면 설명에 구체화된 바와 같이 1 내지 10 mg/kg 범위의 용량으로 복강내 주사를 통해 주 당 2회 투여하였다. 화학치료제를 복강내 주사를 통해 주 당 2회, 파클리탁셀에 대해 12 mg/kg, 플루오로우라실 (5-FU)에 대해 2.3 mg/kg, 및 시스플라틴에 대해 33 mg/kg으로 투여하였다. 요법의 개시 시, 종양 크기를 각각의 마우스에서 1주에 2회 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼를 사용하여 측정하고, 종양 크기를 상기 식에 따라 계산하였다. 피하 종양 부피가 2000 mm^3 을 초과하였을 때 또는 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0237] 결과로서의 종양 부피의 비교를 $P < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 결정하였다. P -값은 종양을 측정한 최종 일에 계산된 종양 부피의 언페어드 양측 t-검정 분석을 사용하여 계산하였다.

[0238] 도 2는 FGFR2 증폭을 갖는 OCUM-2M 인간 위암 이종이식 모델에서의 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 및 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 의 (A 및 B) 10 mg/kg 및 (C 및 D) 3 mg/kg에서의 효능을 나타낸다. (A) 10 mg/kg에서, 푸코실화된 및 비푸코실화된 항체 둘 다는 중간 종양 퇴보를 유도하였다. 그러나, 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 는 푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 보다 더 내구성 반응을 유도하였다. (B) 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 는 푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 에 비해 최종 OCUM-2M 종양 크기를 유의하게 감소시켰다 ($p=0.0153$). 통계학적 유의성은 양측 언페어드 t-검정을 통해 측정되었다. (C) 3 mg/kg로 투여될 경우, 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 는 푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 에 비해 종양 성장을 감소시켰다. 실제로, 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 는 푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 에 비해 더 큰 종양 퇴보 및 내구성 반응을 유도하였다 (주: 한 동물은 곡선에서 이동을 초래하는 약 제42일에 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 군으로부터 제거되었음). (D) 푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bF}$ 에 비해 3 mg/kg으로의 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 는 최종 OCUM-2M 종양 크기를 주목할 만하게 감소시켰다 ($p=0.0767$). 통계학적 유의성은 양측 언페어드 t-검정을 통해 측정하였다.

[0239] 도 3은 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 에 의한 용량-의존적 종양 억제를 나타낸다. (A) 피하 OCUM-2M 이종이식을 갖는 SCID 마우스를 평균 종양 크기가 대략 100 mm^3 에 도달하였을 때 1, 1.5, 2, 3 또는 5 mg/kg 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 로 처리하였다. 모든 용량의 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 가 종양 성장을 억제하였지만, 가장 큰 억제 및 내구성 반응은 3 및 5 mg/kg에서 관측되었고, 감소된 성장 억제는 2, 1.5 및 1 mg/kg $\alpha\text{FGFR2bA}$ 에서 관측되었다. (B) 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 는 최종 OCUM-2M 종양 크기를 감소시켰으며, 보다 높은 용량은 보다 강력한 성장 억제를 나타낸다. 종양 성장 억제는 모든 용량에 대해 통계학적으로 유의하였다 (5 mg/kg, $p<0.0001$; 3 mg/kg, $p<0.0001$; 2 mg/kg, $p<0.0001$; 1.5 mg/kg, $p=0.0003$; 1 mg/kg, $p=0.0013$). 통계학적 유의성은 양측 언페어드 t-검정을 통해 측정하였다.

[0240] 도 4는 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 로의 투여에 의한 OCUM-2M 위암 이종이식 모델에서의 파클리탁셀 항-종양 활성의 향상을 나타낸다. (A) 피하 OCUM-2M 이종이식을 갖는 SCID 마우스를 평균 종양 크기가 대략 285 mm^3 에 도달하였을 때 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ (5 mg/kg), 파클리탁셀 (12 mg/kg), 또는 2가지의 조합으로 처리하였다. 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 와 파클리탁셀의 조합은 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 또는 파클리탁셀 단독에 비해 종양 크기를 감소시켰다. (B) 조합된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ /파클리탁셀 요법은 파클리탁셀 ($p=0.0005$) 또는 $\alpha\text{FGFR2bA}$ ($p=0.0009$) 단독에 비해 최종 OCUM-2M 종양 크기를 유의하게 감소시켰다. 통계학적 유의성은 양측 언페어드 t-검정을 통해 측정하였다.

[0241] 도 5는 비푸코실화된 $\alpha\text{FGFR2bA}$ 로의 투여에 의한 OCUM-2M 위암 이종이식 모델에서의 시스플라틴/5-FU 항-종양 활성의 향상을 나타낸다. (A) 피하 OCUM-2M 이종이식을 갖는 SCID 마우스를 평균 종양 크기가 대략 260 mm^3 에

도달하였을 때 비푸코실화된 αFGFR2bA (5 mg/kg), 플루오로우라실 (5-FU) 플러스 시스플라틴 (각각 2.3 및 33 mg/kg), 또는 3가지의 조합으로 처리하였다. 비푸코실화된 αFGFR2bA와 5-FU/시스플라틴의 조합은 αFGFR2bA 또는 5-FU/시스플라틴 단독에 비해 종양 크기를 감소시켰다. (B) 조합된 αFGFR2bA/5-FU/시스플라틴 요법은 5-FU/시스플라틴에 비해 최종 OCUM-2M 종양 크기를 유의하게 감소시켰다 (p=0.0003). αFGFR2bA 단독에 비해 조합된 αFGFR2bA/5-FU/시스플라틴 요법에 의한 종양 크기의 증가된 감소는 주목할 만했지만, 통계학적으로 유의하지는 않았다. 통계학적 유의성은 양측 언페어드 t-검정을 통해 측정하였다.

[0242] 도 6은 MFM-223 인간 유방암 이종이식 모델에서의 αFGFR2bA의 효능을 나타낸다. (A) FGFR2 증폭을 갖는 인간 유방 암종 세포주인 MFM-223을 SCID 마우스 내로 피하 이식하고, 평균 종양 크기가 대략 80 mm³에 도달하였을 때 비푸코실화된 αFGFR2bA 요법을 개시하였다. 비푸코실화된 αFGFR2bA (5 mg/kg)는 알부민 대조군 (5 mg/kg)에 비해 MFM-223 종양의 성장을 극적으로 감소시켰다. (B) 비푸코실화된 αFGFR2bA는 알부민 대조군에 비해 최종 MFM-223 종양 크기를 유의하게 감소시켰다 (p=0.0008). 통계학적 유의성은 양측 언페어드 t-검정을 통해 측정하였다.

[0243] 실시예 5: 비푸코실화된 항-FGFR2b 항체는 푸코실화된 항-FGFR2b 항체보다 더 큰 ADCC를 매개한다.

[0244] αFGFR2bA 항체 대 αFGFR2bF 항체의 ADCC 활성을 측정하기 위한 시험관내 어세이를 수행하였다. Ba/F3 FGFR2IIIb-발현 표적 세포를 이전에 기재된 바와 같이 생성하였다. OCUM-2M 세포는 일본 오사카의 오사카 시티 유니버시티로부터 얻었다. 모든 세포는 표준 방법을 사용하여 배양하였다. 건강한 공여자로부터의 신선하게 분리된 PMBC는 미국 캘리포니아주 에머리빌의 올셀즈로부터 얻었다.

[0245] ADCC 어세이를 이펙터 세포로서 신선하게 분리된 인간 PBMC를 25:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 세포 비율로 사용하여 수행하였다. 표적 세포를 이펙터 및 증가하는 농도의 항체의 존재 하에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 모든 조건은 3중으로 시험하였다. LDH 방출을 제조자의 권고사항에 따라 (프로메가의 사이토독스 비-방사성 세포독성 어세이) 정량화함으로써 세포독성을 측정하였다. OCUM-2M 세포에 대해, 최대 용해를 5% 트리톤 X-100의 존재 하에서 측정하고, 자발적 방출을 항체의 부재 하에서 측정하였다. 비 용해의 퍼센트는 최대 용해 빼기 자발적 방출의 퍼센트로서 하기와 같이 계산하였다: (실험적 - 자발적 방출) / (최대 - 자발적 방출) x 100 = % 비 용해. 그래프패드 (GraphPad) 소프트웨어 곡선-적합화 분석을 사용하여 EC50 값을 얻었다.

[0246] Ba/F3 세포에 대한 결과를 도 9에 나타낸다. 비푸코실화된 αFGFR2bA 항체는 FGFR2IIIb-발현 Ba/F3 세포에서 푸코실화된 αFGFR2bF 항체보다 더 높은 효능 (보다 낮은 농도에서 더 큰 ADCC 활성)을 나타내었다. OCUM-2M 세포에 대해 유사한 결과를 도 10에 나타낸다. 표 4는 도 9 및 10에 나타낸 2가지 상이한 세포주에서의 푸코실화된 항-FGFR2b 항체에 비한 비푸코실화된 항-FGFRb 항체의 효능 배수 증가를 나타낸다.

[0247] <표 4> 비푸코실화된 대 푸코실화된 항-FGFR2b 항체의 효능 배수 증가

EC50 (ng/mL)			
세포	αFGFR2bA	αFGFR2bF	αFGFR2bA의 효능 배수 증가
OCUM-2M	5	30	6
BaF3 FGFR2b	2	16	8

[0248]

[0249] 실시예 6: 종양 조직에서의 FGFR2IIIb 단백질의 면역조직화학적 검출

[0250] GAL-FR21의 무린 가변 영역 (미국 특허 제8,101,723 B2호 참조) 및 무린 IgG2a 불변 영역을 포함하는 무린 αFGFR2b 항체를 사용하여 포르말린-고정된 파라핀 삽입된 (FFPE) 위 종양 조직에서 FGFR2IIIb 단백질을 검출하였다. FFPE 종양 조직을 크실렌 및 감소하는 농도의 에탄올의 연속적 세척으로 탈-파라핀화시키고, 물로 5분 동안 재수화시켰다. 슬라이드-실장된 조직 섹션을 95℃ 내지 99℃로 15분 동안 가열한 0.1 mM 시트레이트 완충액 (pH 6.0)에 침지시켰다. 조직 섹션을 냉각시키고, 실온에서 5분 동안 3% H₂O₂와 접촉시킨 후, TBST (0.05M 트리스, 0.15M NaCl, 0.05% 트윈 20)에서 2회 세척하고, 실온에서 30분 동안 블로킹 완충액 (TBST 중 2.5% 정상 말 혈청)으로 블로킹하였다. 그 후, 조직 섹션을 블로킹 완충액 중 5 μg/ml αFGFR2b 항체로 실온에서 30

분 동안 인큐베이션하였다. 30분 내지 2시간의 인큐베이션 시간은 유사한 염색 강도를 생성하였다. TBST 완충액으로 3회 세척한 후, 조직 섹션을 바로 사용 (ready-to-use; RTU) 비오티닐화된 2차 말 항-마우스 항체 (블로킹 완충액에 희석된 10 µg/ml, 벡터 래버러토리즈 (Vector Laboratories), 미국 캘리포니아주 벨링에임; 카탈로그 번호 PK-7200)로 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 조직 섹션을 TBST 완충액으로 2회 세척하고, RTU 스트렙타비딘-말 무 퍼옥시다제 (HRP; 벡터 래버러토리즈, 카탈로그 번호 PK-7200)로 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 3',3'-디아미노벤지딘 (DAB) 기질 (벡터 래버러토리즈, 카탈로그 번호 PK-4105)을 사용하여 실온에서 10분 동안 제조자의 지시서에 따라 검출을 수행하였다. 그 후, 조직 섹션을 헤마톡실린 (데이코 노쓰 아메리카 (Dako North America), 미국 캘리포니아주 카르핀테리아, 카탈로그 번호 K-8008)으로 제조자의 지시서에 따라 대비-염색하였다. 조직 섹션을 증가하는 농도의 에탄올 및 크실렌으로 연속적 세척을 사용하여 탈수화시킨 후, 커버슬립으로 덮었다.

- [0251] 0.1 내지 5 mg/ml αFGFR2b 항체의 염색 농도가 단백질 검출에 특히 유효한 것으로 밝혀졌다.
- [0252] 염색을 하기와 같이 점수화하였다:
- [0253] 0 관측된 αFGFR2b 항체로의 염색이 없다.
- [0254] 1+ αFGFR2b 항체로 염색된 샘플에서 희미한 염색이 관측된다. 음성 대조군 항체로 염색된 상응하는 섹션에는 염색이 없다.
- [0255] 2+ αFGFR2b 항체에 특이적인 막-세포질 염색이 섹션에서 보다 우세하다.
- [0256] 3+ 염색된 종양 세포의 적어도 하위집합에서의 뚜렷한 막 편재를 갖는 αFGFR2b 항체로의 강한 특이적 염색.
- [0257] 도 11은 종양 조직의 예시적인 0 (A), 1+ (B, C), 2+ (D), 및 3+ (E, F) 염색을 나타낸다. 도 11A에서, 관상 세포 및 산재된 종양 세포는 αFGFR2b 항체를 사용한 염색의 부재를 나타낸다. 간질 유형 위 종양 샘플을 나타내는 도 11B에서, 종양 세포 (화살표)는 αFGFR2b 항체를 사용한 일부 염색을 나타내는 반면, 주변의 관상 세포는 염색을 나타내지 않는다. 확산-유형 위 종양 샘플을 나타내는 도 11C에서, 종양 세포 (화살표)는 αFGFR2b 항체를 사용한 일부 염색을 나타내는 반면, 주변의 기질 세포 (화살촉)는 염색을 나타내지 않는다. 도 11D에서, 종양 세포 (화살표)는 αFGFR2b 항체를 사용한 중간 염색을 나타내는 반면, 주변의 기질 세포 (화살촉)는 염색을 나타내지 않는다. 도 11E에서, 종양 세포 (화살표)는 αFGFR2b 항체를 사용한 높은 막-편재된 염색을 나타내는 반면, 주변의 기질 세포 (화살촉)는 염색을 나타내지 않는다. 도 11F에서, 종양 세포 (화살표)는 αFGFR2b 항체를 사용한 높은 막/세포질 염색을 나타내는 반면, 주변의 기질 세포 (화살촉)는 염색을 나타내지 않는다.

[0258] 서열표

서열	설명	서열
1	성숙 인간 FGFR2IIIb	RPSFSLVED TLEPEEPPT KYQISQPEVY VAAPGESLEV RCLLKDAAVI SWTKDGVHLG PNNRTVLIGE YLQIKGATPR DSGLYACTAS RTVDSETWYF MVNVTDAISS GDEDDTDGA EDFVSENSNN KRAPYWTNTE KMEKRLHAVP AANTVKFRCP AGGNPMPTMR WLKNGKEFKQ EHRIGGYKVR NQHWSLIMES VVP SDKGNVT CVVENEYGSI NHTYHLDVVE RSPHRPILQA GLPANASTVV GGDVEFVCKV YSDAQPHIQW IKHVEKNGSK YGPDGLPYLK VLKHSGINSS NAEVLALFNV TEADAGEYIC KVSNIYIQAN QSAWLTVLPK QQAPGREKEI TASP DYLEIA IYCIGVFLIA CMVVTVILCR MKNTTKKPDF SSQPAVHKLT KRIPLRRQVT VSAESSSSMN SNTPLVRITT RLSSTADTPM LAGVSEYELP EDPKWEFPRD KLTLGKPLGE GCFGQVMAE AVGIDKDKPK EAVTVAVKML KDDATEKDLS DLVSEMEMMK MIGKHKNIIN LLGACTQDGP LYVIVEYASK GNLREYLRAR RPPGMEYSYD INRVPEEQMT FKDLVSCITYQ LARGMEYLAS QKCIHRDLAA RNVLV TENNV MKIADFGLAR DINNIDYYKK TTNGRLPVKW MAPEALFDRV YTHQSDVWSF GVLWEIFTL GGSPYPGIPV EELFKLLKEG HRMDKPANCT NELYMMMRDC WHAVPSQRPT FKQLVEDLDR ILTLTTNEEY LDLSQPLEQY SPSYPDTRSS CSSGDDSVFS PDPMPYEPCL PQYPHINGSV KT
2	α FGFR2b 중쇄; Asn297은 볼드체 및 밑줄로 표시된다	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYIFT TYNVHWVRQA PGQGLEWIGS IYPDNGDTSY NQNFKGRATI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARGD FAYWGQGLTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
3	α FGFR2b 경쇄	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQGVN NDVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASYRYTGVPN RFSGSGSGTD FTFITISLQP EDIATYYCQQ HSTTPYTFGQ GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
4	α FGFR2b 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYIFT TYNVHWVRQA PGQGLEWIGS IYPDNGDTSY NQNFKGRATI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARGD FAYWGQGLTV TVSS
5	α FGFR2b 경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQGVN NDVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASYRYTGVPN RFSGSGSGTD FTFITISLQP EDIATYYCQQ HSTTPYTFGQ GTKLEIK
6	α FGFR2b 중쇄 (HC) HVR1	TYNVH
7	α FGFR2b HC HVR2	SIYPDNGDTS YNQNFKG
8	α FGFR2b HC HVR3	GDFAY

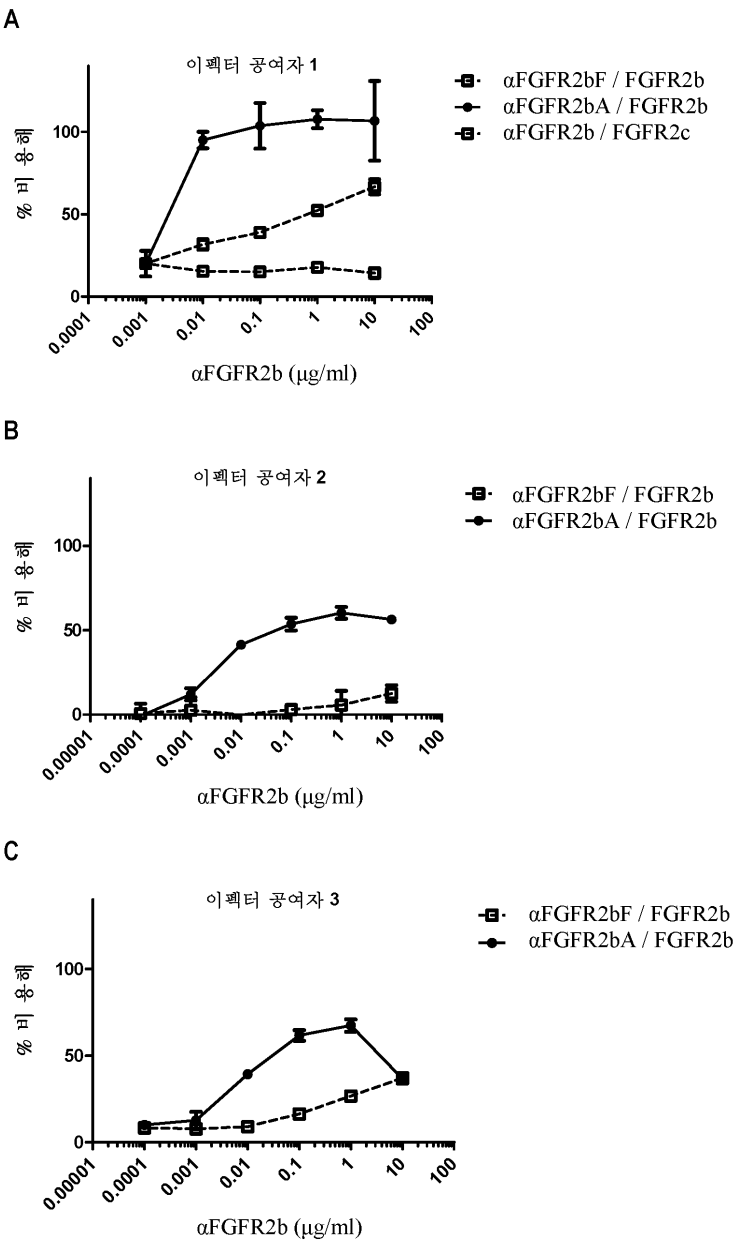
[0259]

9	α FGFR2b 경쇄 (LC) HVR1	KASQGVSN DV A
10	α FGFR2b LC HVR2	SASYRYT
11	α FGFR2b LC HVR3	QQHSTTPYT
12	성숙 인간 FGFR2IIc	RPSFSLVED TLEPEEPPT KYQISQPEVY VAAPGESLEV RCLLKDAAVI SWTKDGVHLG PNNRTVLIGE YLQIKGATPR DSGLYACTAS RTVDSETWYF MVNVTDAISS GDEDDTDGA EDFVSENSNN KRAPYWTNTE KMEKRLHAVP AANTVKFRCP AGGNPMPTMR WLKNGKEFKQ EHRIGGYKVR NQHWSLIMES VVPSDKGNYT CVVENEYGSI NHTYHLDVVE RSPHRPILQA GLPANASTVV GGDVEFVCKV YSDAQPHIQW IKHVEKNGSK YGPDGLPYLK VLKAAGVNTT DKEIEVLYIR NVTFEDAGEY TCLAGNSIGI SFHSAWLTVL PAPGREKEIT ASPDYLEIAI YCIGVFLIAC MVVTVILCRM KNTTKKPDFS SQPAVHKLTk RIPLRRQVTV SAESSSSMNS NTPLVRITTR LSSTADTPML AGVSEYELPE DPKWEFFPRDK LTLGKPLGEG CFGQVVMAEA VGIDKDKPKE AVTVAVKMLK DDATEKDLSD LVSEMEMMMK IGKHKNIINL LGACTQDGPL YVIVEYASKG NLREYLRARR PPGMEYSYDI NRVPEEQMTF KDLVSCTYQL ARGMEYLASQ KCIHRDLAAR NVLVTENNVM KIADFGGLARD INNIDYYKKT TNGRLPVKWM APEALFDRVY THQSDVWSFG VLMWEIFTLG GSPYPGIPVE ELFKLLKEGH RMDKPANCTN ELYMMMRDCW HAVPSQRPTF KQLVEDLDRI LTLTTNEEYL DLSQPLEQYS PSYPDTRSSC SSGDDSVFSP DPMPYEPCLP QYPHINGSVK T

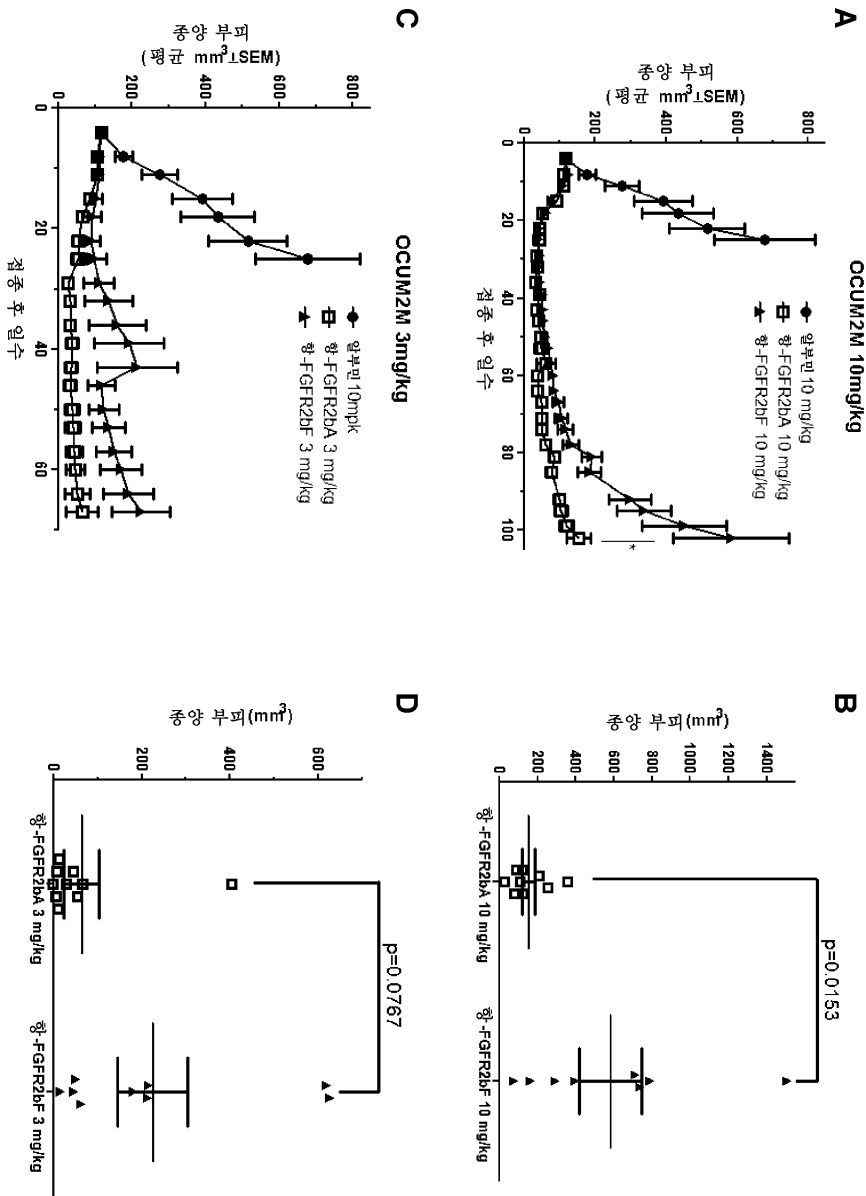
[0260]

도면

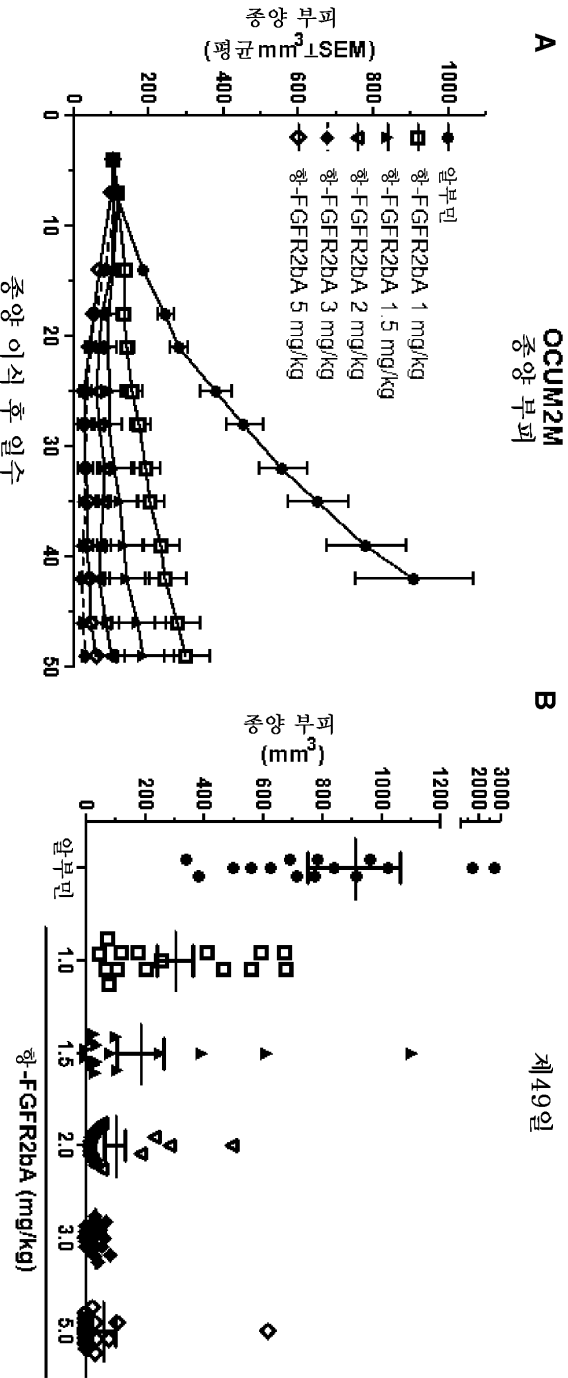
도면1



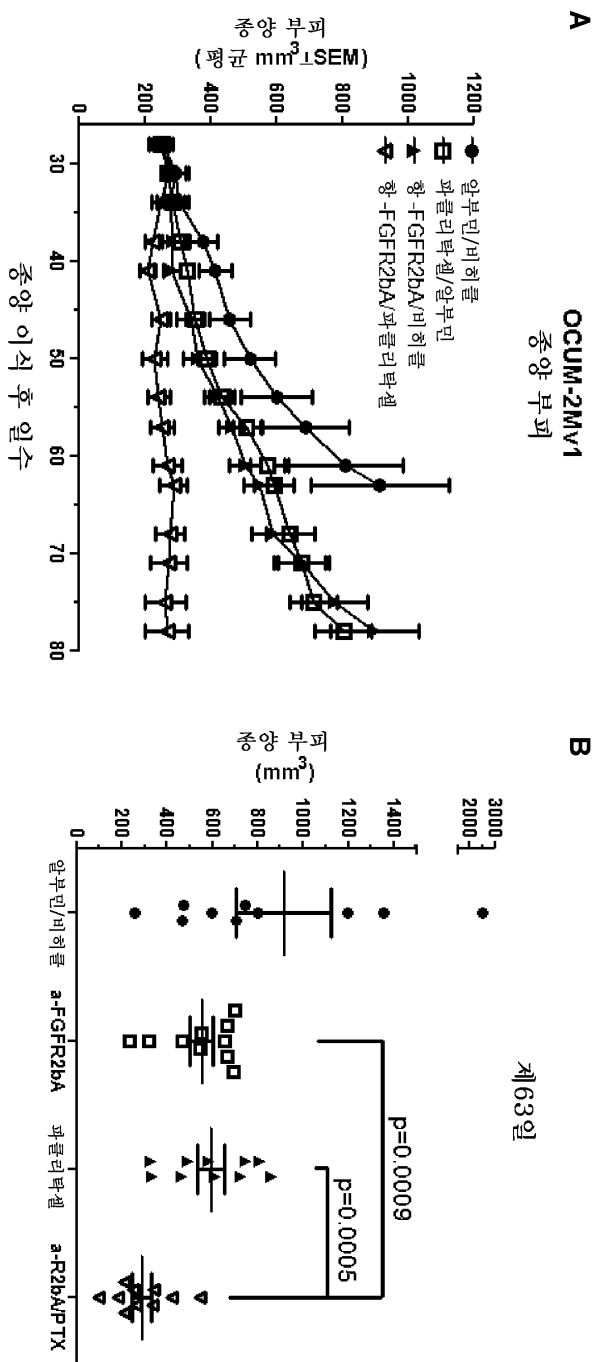
도면2



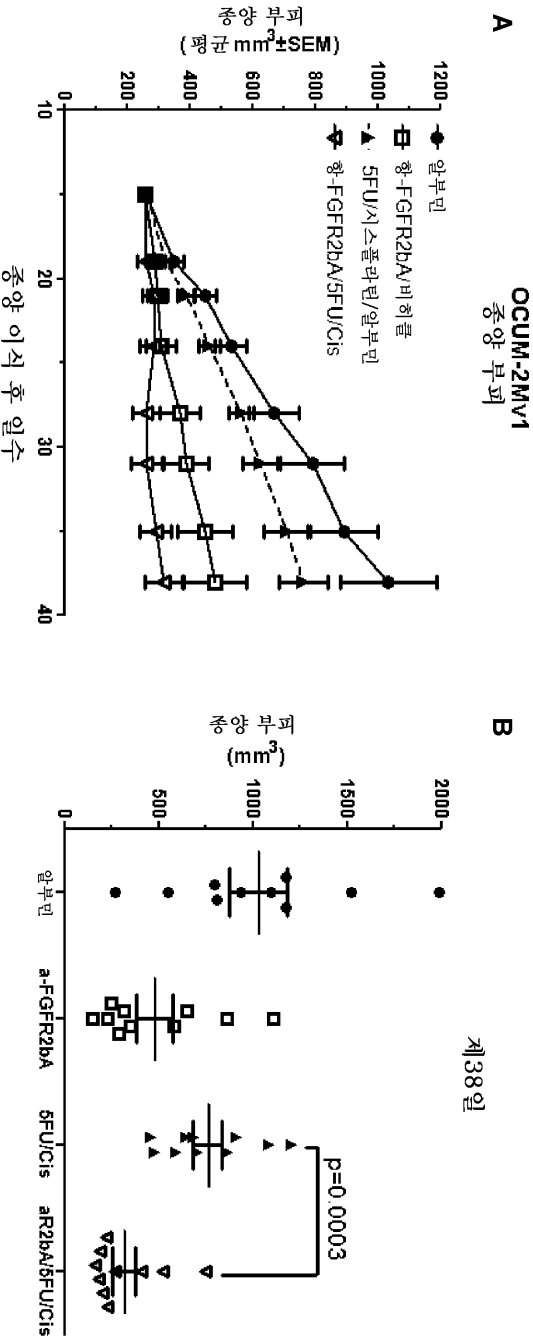
도면3



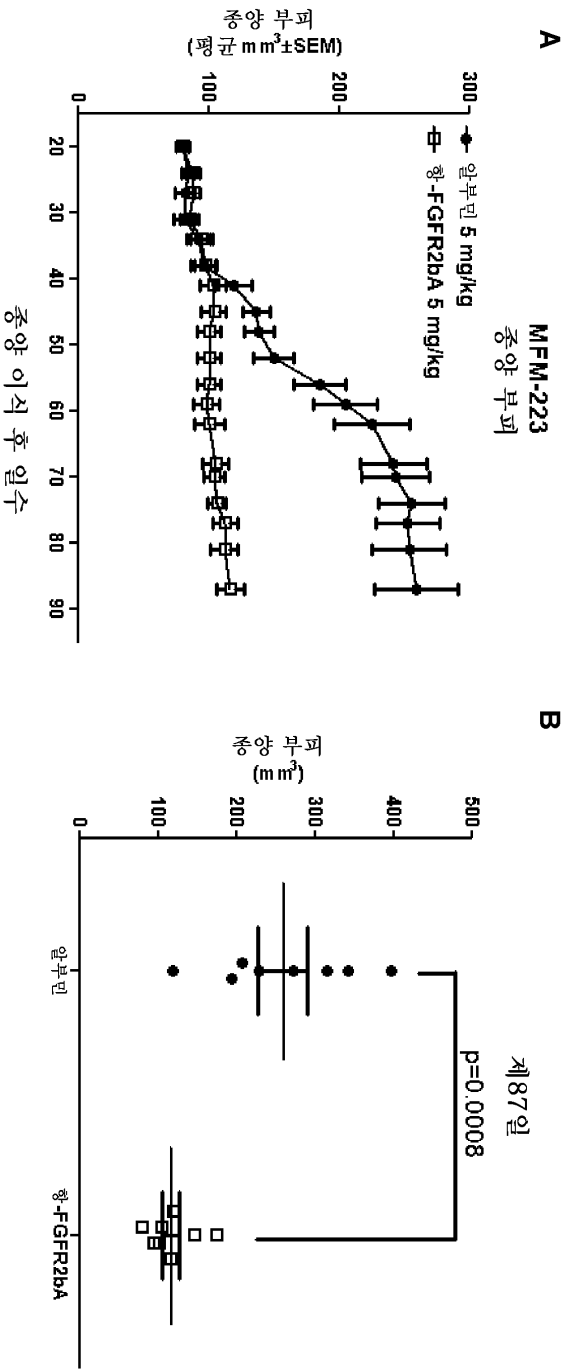
도면4



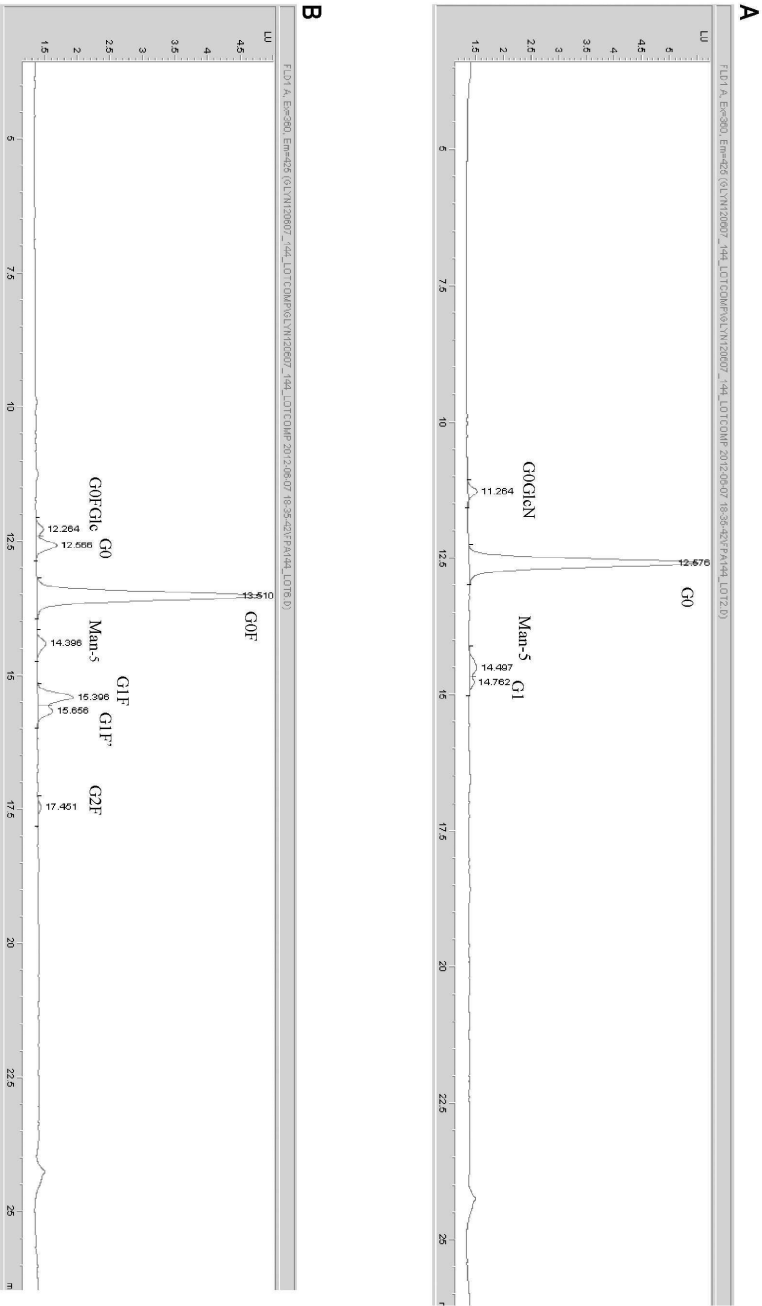
도면5



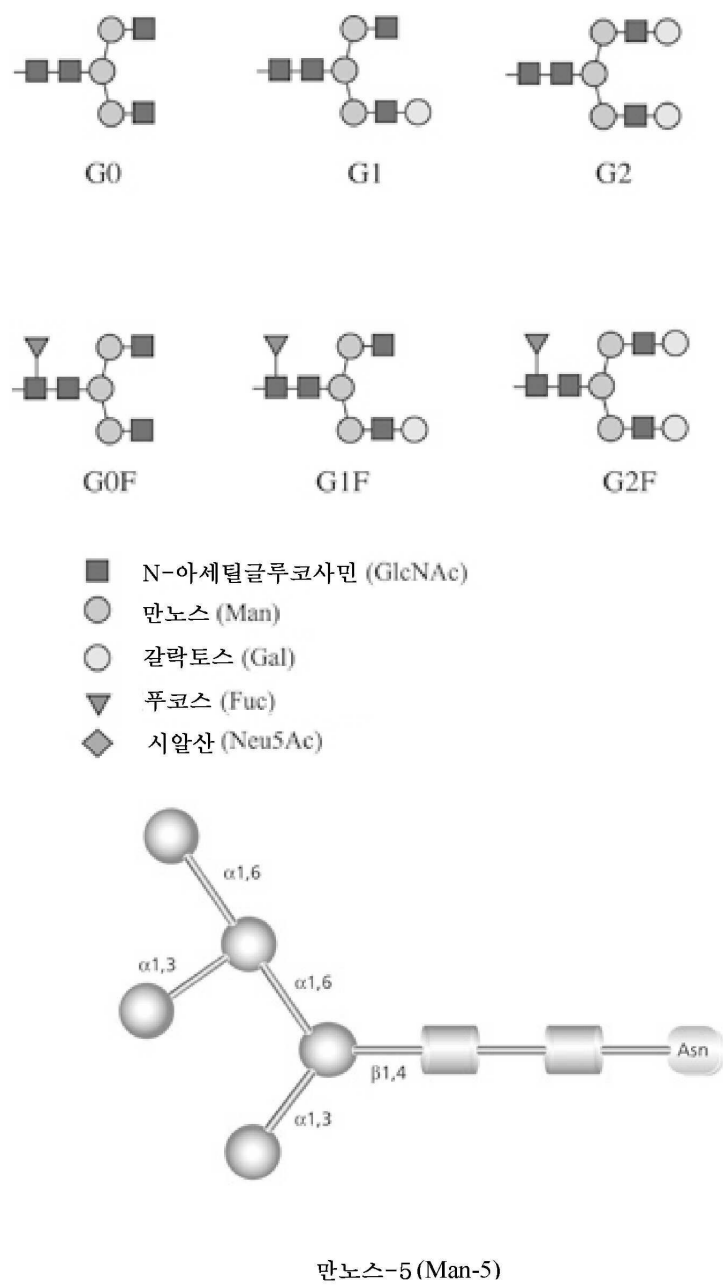
도면6



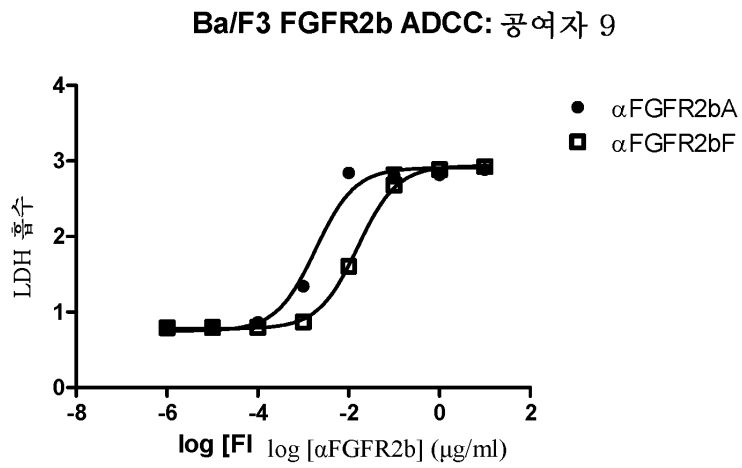
도면7



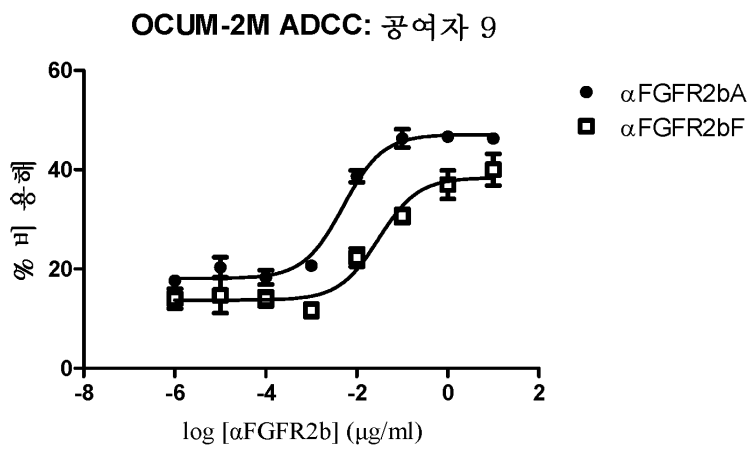
도면8



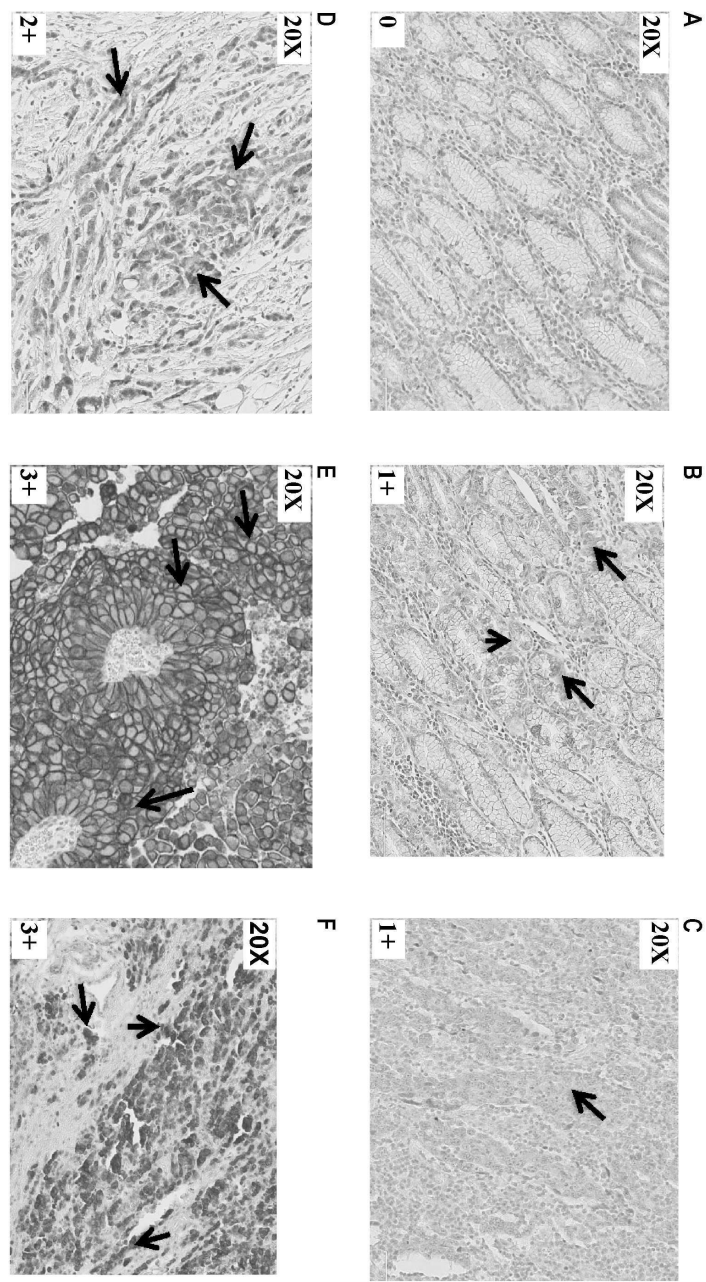
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.

<120> AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES

<130> FPT-33453/WO-1/ORD

<150> US 61/861,198

<151> 2013-08-01

<150> US 61/901,732

<151> 2013-11-08

<150> US 61/933,632

<151> 2014-01-30

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 801

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val

35 40 45

Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr

50 55 60

Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp

100 105 110

Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn

115 120 125

Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg

130 135 140

Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala

145 150 155 160

Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu

165	170	175	
Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His			
180	185	190	
Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr			
195	200	205	
Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His			
210	215	220	
Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly			
225	230	235	240
Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val			
245	250	255	
Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His			
260	265	270	
Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu			
275	280	285	
Lys Val Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asn Ala Glu Val Leu			
290	295	300	
Ala Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val			
325	330	335	
Leu Pro Lys Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser			
340	345	350	
Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile			
355	360	365	
Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr Thr			
370	375	380	
Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr Lys			
385	390	395	400
Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser			
405	410	415	

Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser
420 425 430

Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu
435 440 445

Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly
450 455 460

Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala
465 470 475 480

Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val
485 490 495

Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val
500 505 510

Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile
515 520 525

Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val
530 535 540

Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg
545 550 555 560

Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu
565 570 575

Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg
580 585 590

Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala
595 600 605

Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp
610 615 620

Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr
625 630 635 640

Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe
645 650 655

Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu

660 665 670
Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro
675 680 685
Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys
690 695 700
Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp
705 710 715 720

His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp
725 730 735
Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Tyr Leu Asp Leu
740 745 750
Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Arg Ser
755 760 765
Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met Pro
770 775 780

Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val Lys
785 790 795 800
Thr

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Asn Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

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

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

 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440
<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			115					120					125		
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
			130					135					140		
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145						150					155				160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ Synthetic

 $\langle 400 \rangle$ 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400

> 5

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Thr Tyr Asn Val His

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

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

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Gly Asp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 800

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val

35 40 45

Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr

50 55 60

Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp

100	105	110	
Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn			
115	120	125	
Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg			
130	135	140	
Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala			
145	150	155	160
Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu			
165	170	175	
Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His			
180	185	190	
Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr			
195	200	205	
Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His			
210	215	220	
Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly			
225	230	235	240
Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val			
245	250	255	
Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His			
260	265	270	
Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu			
275	280	285	
Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu			
290	295	300	
Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr			
305	310	315	320
Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu			
325	330	335	
Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro			
340	345	350	

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

 385 390 395 400
 Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser Ser
 405 410 415
 Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser Ser
 420 425 430
 Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro
 435 440 445
 Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly Lys

 450 455 460
 Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Val
 465 470 475 480
 Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val Lys
 485 490 495
 Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser
 500 505 510
 Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn

 515 520 525
 Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu
 530 535 540
 Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro
 545 550 555 560
 Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu Gln
 565 570 575
 Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg Gly

 580 585 590
 Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala

595 600 605
 Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe
 610 615 620
 Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr
 625 630 635 640
 Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp

 645 650 655
 Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met
 660 665 670
 Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val
 675 680 685
 Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro
 690 695 700
 Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His

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

 770 775 780
 Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val Lys Thr
 785 790 795 800