

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0140852

(43) 공개일자 2020년12월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/74 (2006.01) C07K 16/26 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/74 (2013.01)
C07K 16/26 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7031566
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년11월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/025726
- (87) 국제공개번호 WO 2019/195514
국제공개일자 2019년10월10일
- (30) 우선권주장
62/652,701 2018년04월04일 미국(US)

- (71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
로웨, 존, 호크 닌
미국 94080 캘리포니아주 샌 사우쓰 샌 프란시스
코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
- 소노다, 준이치로
미국 94080 캘리포니아주 샌 사우쓰 샌 프란시스
코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
- (74) 대리인
장덕순, 이귀동

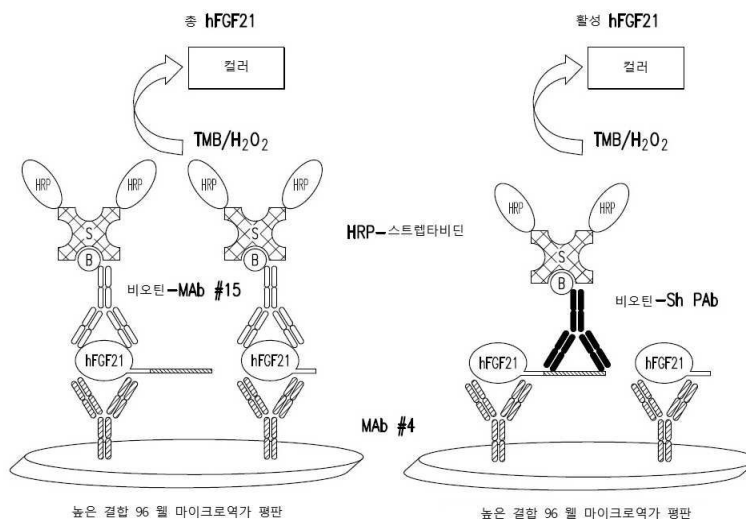
전체 청구항 수 : 총 89 항

(54) 발명의 명칭 FGF21을 검출하고 정량하기 위한 방법

(57) 요약

본원에서 개시된 요부는 FGF21에 결합하는 항체 및 이들을 이용하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 표본 내 활성 및 총 FGF21 수준을 검출하고 정량하기 위한 면역검정 방법 및 이런 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)

G01N 2333/50 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표본(sample) 내 총 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정 방법이며,

- (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계,
- (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계,
- (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계, 및
- (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여, 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함하는 면역검정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 포획 항체 및 검출 항체가 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 면역검정 방법.

청구항 3

표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정 방법이며,

- (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계,
- (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계,
- (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계, 및
- (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여, 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함하는 면역검정 방법.

청구항 4

표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 면역검정 방법이며,

- (a) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하고,
- (ii) 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체와 접촉시키고,
- (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 첫 번째 검출 항체를 검출하고,
- (iv) 결합된 첫 번째 검출 항체의 수준에 기초하여, 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계,
- (b) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하고,
- (ii) 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체와 접촉시키고,
- (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 두 번째 검출 항체를 검출하고,

(iv) 결합된 두 번째 검출 항체의 수준에 기초하여, 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계, 및

(c) 단계 (a)에 의해 결정된 총 FGF21 단백질의 양을 단계 (b)에 의해 결정된 대로의 활성 FGF21 단백질의 양과 비교하여, 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하는 단계

를 포함하는 면역검정 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체가 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 면역검정 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체가 동일한 항체인 면역검정 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 면역검정이 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)인 면역검정 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이 상자성 비드에 고정되는 것인 면역검정 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체, 첫 번째 검출 항체 및 두 번째 검출 항체 중 하나 이상이 비오틴에 접합되는 것인 면역검정 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합하는 것인 면역검정 방법.

청구항 11

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합하는 것인 면역검정 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 표본이 혈액 표본인 면역검정 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 표본이 혈장 표본인 면역검정 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 약 2 pg/ml 내지 약 20 pg/ml의 웰내 민감도로 검출하는 면역검정 방법.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 분자 검출 기기를 이용하여 수행되는 면역검정 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 단일 분자 검출 기기가 퀀터릭스 시모아 HD-1 어날라이저(Quanterix Simoa HD-1 Analyzer)TM

인 면역검정 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 웰내 민감도로 검출하는 면역검정 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상

(a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상

(a) 서열 번호: 54, 55, 74 및 75로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 50, 51, 70 및 71로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상

(a) 서열 번호: 22, 23, 66 및 67로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 18, 19, 62 및 63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 21

제1항 및 제4항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상

(a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변

영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 22

제1항 및 제4항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 56, 57, 72 및 73으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 52, 53, 68 및 69로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 23

제1항 및 제4항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 24, 25, 64 및 65로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 20, 21, 60 및 61로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 27

제21항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 면역검정 방법.

청구항 30

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합하는 것인 면역검정 방법:

(a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변

영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.

청구항 31

제1항 및 제4항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합하는 것인 면역검정 방법:

(a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.

청구항 32

표본 내 총 FGF21 단백질을 검출하기 위한 키트이며,

(a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체 또는 이의 항원 결합 부분,

(b) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체 또는 이의 항원 결합 부분, 및

(c) 검출 작용제

를 포함하는 키트.

청구항 33

제32항에 있어서, 포획 항체 및 검출 항체가 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 키트.

청구항 34

표본 내 활성 FGF21 단백질을 검출하기 위한 키트이며,

(a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체 또는 이의 항원 결합 부분,

(b) FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체 또는 이의 항원 결합 부분, 및

(c) 검출 작용제

를 포함하는 키트.

청구항 35

표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 키트이며,

- (a) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체 또는 이의 항원 결합 부분 및
 - (ii) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체 또는 이의 항원 결합 부분,
 - (b) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체 또는 이의 항원 결합 부분 및
 - (ii) FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체 또는 이의 항원 결합 부분, 및
 - (c) 하나 또는 그 이상의 검출 작용제
- 를 포함하는 키트.

청구항 36

제35항에 있어서, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체가 동일한 항체인 키트.

청구항 37

제35항에 있어서, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체가 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 키트.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이 상자성 비드에 고정되는 것인 키트.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체, 첫 번째 검출 항체 및 두 번째 검출 항체 중 하나 이상이 비오틴에 접합되는 것인 키트.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 작용제가 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 접합체, 스트렙타비딘-양고추냉이 과산화효소 접합체, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것인 키트.

청구항 41

제40항에 있어서, 레조루핀 β-D-갈락토피라노시드, 테트라메틸벤지딘, 과산화수소 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 키트.

청구항 42

제32항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합하는 것인 키트.

청구항 43

제32항 및 제35항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합하는 것인 키트.

청구항 44

제32항 및 제35항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 또는 첫 번째 검출 항체가 약 0.1 μg/ml 내지 약 1 μg/ml의 농도를 갖는 것인 키트.

청구항 45

제33항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 또는 두 번째 검출 항체 중 하나 이상이 약 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는 것인 키트.

청구항 46

제40항에 있어서, 스트렙타비딘- β -D-갈락토피라노오스 접합체가 약 100 pM 내지 약 400 pM의 농도를 갖는 것인 키트.

청구항 47

제32항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

- (a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,
 - (b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,
 - (c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,
 - (d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,
 - (e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및
 - (f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인
- 을 포함하는 것인 키트.

청구항 48

제32항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

- (a) 서열 번호: 54, 55, 74 및 75로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
 - (b) 서열 번호: 50, 51, 70 및 71로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 것인 키트.

청구항 49

제32항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

- (a) 서열 번호: 22, 23, 66 및 67로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및
 - (b) 서열 번호: 18, 19, 62 및 63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄
- 를 포함하는 것인 키트.

청구항 50

제32항 및 제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 키트.

청구항 51

제32항 및 제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 56, 57, 72 및 73으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 52, 53, 68 및 69로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 키트.

청구항 52

제32항 및 제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 24, 25, 64 및 65로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 20, 21, 60 및 61로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인 키트.

청구항 53

제47항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 키트.

청구항 54

제53항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 키트.

청구항 55

제54항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인 키트.

청구항 56

제50항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 키트.

청구항 57

제56항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 키트.

청구항 58

제57항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이

(a) 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인 키트.

청구항 59

제32항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중 하나 이상이 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합하는 것인 키트:

(a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변

영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.

청구항 60

제32항 및 제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중 하나 이상이 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합하는 것인 키트:

(a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.

청구항 61

제32항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 표본이 혈액 표본인 키트.

청구항 62

제32항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 표본이 혈장 표본인 키트.

청구항 63

제32항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 웰내 민감도로 검출하는 키트.

청구항 64

(a) 서열 번호: 26-29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,

(b) 서열 번호: 30-33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

(c) 서열 번호: 34-37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,

(d) 서열 번호: 38-41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,

(e) 서열 번호: 42-45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영

역 CDR2 도메인, 및

(f) 서열 번호: 46-49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인

을 포함하는, 단리된 항-FGF21 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 65

제64항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,
 - (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,
 - (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,
 - (d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,
 - (e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및
 - (f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인
- 을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 66

제64항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 27의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,
 - (b) 서열 번호: 31의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,
 - (c) 서열 번호: 35의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,
 - (d) 서열 번호: 39의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,
 - (e) 서열 번호: 43의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및
 - (f) 서열 번호: 47의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인
- 을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 67

제64항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 28의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,
 - (b) 서열 번호: 32의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,
 - (c) 서열 번호: 36의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,
 - (d) 서열 번호: 40의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,
 - (e) 서열 번호: 44의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및
 - (f) 서열 번호: 48의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인
- 을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 68

제64항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1,
- (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인,

- (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인,
- (d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인,
- (e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 및
- (f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 69

제65항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 70

제66항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 55의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 서열 번호: 51의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 71

제67항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 56의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 서열 번호: 52의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 72

제68항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 73

제65항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 75의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 서열 번호: 71의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 74

제66항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 74의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 서열 번호: 70의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 75

제67항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 73의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
 - (b) 서열 번호: 69의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 76

제68항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 72의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
 - (b) 서열 번호: 68의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 77

제69항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및
 - (b) 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄
- 를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 78

제70항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및
 - (b) 서열 번호: 19의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄
- 를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 79

제71항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 24의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및
 - (b) 서열 번호: 20의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄
- 를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 80

제72항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및
 - (b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄
- 를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 81

제73항에 있어서,

- (a) 서열 번호: 67의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 63의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 82

제74항에 있어서,

(a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 62의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 83

제75항에 있어서,

(a) 서열 번호: 65의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 61의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 84

제76항에 있어서,

(a) 서열 번호: 64의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 60의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 85

제64항 내지 제84항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 86

제85항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 87

제86항의 숙주 세포를 배양하여 상기 항체가 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 88

제87항에 있어서,

숙주 세포로부터 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제64항 내지 제84항 중 어느 한 항의 하나 이상의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

관련된 출원에 대한 교차 참조

본 출원은 2018년 4월 4일자 제출된 U.S. 특허가출원 번호 62/652,701에 우선권을 주장하고, 이것의 개시는 본

원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 서열 목록을 내포하는데, 이것은 EFS-Web을 통해 ASCII 형식으로 제출되었고 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 2019년 4월 2일자에 창출된 상기 ASCII 사본은 00B206_0809_SL.txt로 명명되고 크기에서 105,595 바이트이다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 FGF21에 결합하는 항체뿐만 아니라 이를 이용한 면역검정 방법 및 키트에 관계한다.

배경 기술

[0007] **배경**

[0008] 섬유모세포 성장 인자 21 (FGF21)은 FGF 상과의 내분비 구성원이고, 그리고 글루코오스 및 지질 대사의 조절에서 일정한 역할을 수행한다. FGF21은 신호전달을 위해 FGF-수용체 (FGFR) 동종형 및 막-결합된 공동수용체 Klotho-베타 (KLB)를 필요로 한다 (Ogawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(18):7432-37 (2007); US 2010/0184665). FGF21은 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감도에 대한 유익한 효과를 갖는 강력한 질환-변경 단백질이고, 그리고 동물 질환 모형에서 비만 및 2형 당뇨병을 반전시키는 것으로 밝혀졌다 (Kharitonov et al. *J. Clin. Invest.* 115(6): 1627-35 (2005)). 재조합 FGF21의 투여는 렙틴-신호전달-결합성 (ob/ob 또는 db/db) 생쥐 또는 고지방 식이 (HFD)-급이된 생쥐에서 간 지질을 감소시키고, 인슐린 민감도를 향상시키고, 혈당 제어를 정상화하는 것으로 밝혀졌다 (Dunshee et al. *J. Biol. Chem.* 291(11):5986-96 (2016); US 2015/0218276). 혈당에서 감소 및 다양한 심혈관 위험 요인에서 향상이 또한, 재조합 FGF21로 매일 치료된 비만한 당뇨병성 붉은 털 원숭이에서 관찰되었다.

[0009] FGF21은 N 말단 및 C 말단 둘 모두에서 단백질분해적으로 개열될 수 있고, 그리고 이런 개열은 FGF21의 활성에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. N 말단에서, 인간 FGF21에서 서열 His-Pro-Ile-Pro (HPIP (서열 번호: 76))를 갖는 첫 4개의 아미노산은 디펩티딜 펩티드분해효소에 의해 개열될 수 있다 (Dunshee et al. (2016)). C 말단에서, 엔도펩티다아제 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP)은 가장 말단의 10개 아미노산을 개열하는데, 이들 아미노산은 인간 FGF21에서 아미노산 서열 Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser (SQGRSPSYAS (서열 번호: 77))를 갖는다 (Dunshee et al. (2016)). 4개의 N 말단 아미노산을 결합하는 FGF21은 완전히 활성이고; 반면, 마지막 10개의 C 말단 아미노산을 결합하는 FGF21은 공동수용체 KLB에 결합할 수 없고 비활성이다 (Yie et al. *FEBS Letters* 583:19-24 (2009)).

[0010] 순환하는 FGF21은 대사 장애, 예컨대 당뇨병에 대한 생물마커인 것으로 제안되었는데, 그 이유는 FGF21의 증가된 혈청 수준이 비만한 개체에서, 비알코올성 지방간 질환 (NAFLD)을 앓는 개체에서 및 2형 당뇨병을 앓는 개체에서 관찰되었기 때문이다 (Zhang et al. *Diabetes* 57(5):1246-1253 (2008); Li et al. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93(1):10-16 (2011)). 대사 장애의 치료와 발달에서 FGF21에 대한 유의미한 역할을 고려하면, 개체에서 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 검정이 당해 분야에서 여전히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] **요약**

[0012] 본 발명은 섬유모세포 성장 인자 21 (FGF21)에 결합하는 항체, 그리고 표본 내 FGF21 단백질, 예를 들면, 총 및/또는 활성 FGF21 단백질의 검출과 정량을 위한 면역검정 방법에서 이런 항체의 용도를 제공한다.

[0013] 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 총 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정을 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 표본 내 총 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 방법은 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계, (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계, (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계, 그리고 (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 포획 항체 및 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.

- [0014] 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정을 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 방법은 (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계, (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계, (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계, 그리고 (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0015] 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 면역검정을 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 상기 방법은 (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계, (ii) 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체와 접촉시키는 단계, (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 첫 번째 검출 항체를 검출하는 단계, 그리고 (iv) 결합된 첫 번째 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계, (ii) 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체와 접촉시키는 단계, (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 두 번째 검출 항체를 검출하는 단계, 그리고 (iv) 결합된 두 번째 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체는 동일한 항체이다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0016] 일정한 구체예에서, 상기 면역검정 방법은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)이다. 일정한 구체예에서, 상기 면역검정 방법은 약 2 pg/ml 내지 약 20 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다.
- [0017] 일정한 구체예에서, 상기 면역검정 방법은 예를 들면, Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™를 이용하는 단일 분자 검출 검정이다. 일정한 구체예에서, 상기 면역검정 방법은 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다.
- [0018] 본 발명은 FGF21 단백질의 검출과 정량을 위한 면역검정 방법을 수행하기 위한 키트를 더욱 제공한다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 총 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 키트를 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 총 FGF21 단백질의 양을 정량하기 위한 키트는 (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체, (b) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체 및 (c) 검출 작용제를 포함한다. 일정한 구체예에서, 포획 항체 및 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0019] 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 키트를 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 활성 FGF21 단백질의 양을 정량하기 위한 키트는 (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체, (b) FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체 및 (c) 검출 작용제를 포함한다.
- [0020] 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 키트를 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 키트는 (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체, (b) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체, (c) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체, (d) FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체 및 (e) 하나 또는 그 이상의 검출 작용제를 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체는 동일한 항체이다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0021] 일정한 구체예에서, 검출 항체, 첫 번째 검출 항체 및/또는 두 번째 검출 항체를 검출하기 위한 검출 작용제는 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 접합체, 스트렙타비딘-양고추냉이 과산화효소 접합체, 그리고 이들의 조합

으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일정한 구체예에서, 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 접합체는 약 100 pM 내지 약 400 pM의 농도를 갖는다.

[0022] 일정한 구체예에서, 본 발명의 키트는 레조루핀 β-D-갈락토피라노시드, 테트라메틸벤지딘, 과산화수소 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본 발명의 키트는 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 접합체를 검출 작용제로 포함할 수 있고, 그리고 레조루핀 β-D-갈락토피라노시드를 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 키트는 스트렙타비딘-양고추냉이 과산화효소 접합체를 검출 작용제로 포함할 수 있고, 그리고 테트라메틸벤지딘 및 과산화수소를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 키트는 약 2 pg/ml 내지 약 20 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 키트는 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다.

[0024] 일정한 구체예에서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 또는 두 번째 포획 항체는 상자성 비드에 고정된다. 일정한 구체예에서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및/또는 두 번째 포획 항체는 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합한다. 일정한 구체예에서, 검출 항체, 첫 번째 검출 항체 및 두 번째 검출 항체는 비오틴에 접합된다. 일정한 구체예에서, 검출 항체 및/또는 첫 번째 검출 항체는 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합한다. 일정한 구체예에서, 총 FGF21 단백질의 양을 결정하는 데 이용을 위한 검출 항체 및/또는 첫 번째 검출 항체는 약 0.1 μg/ml 내지 약 1 μg/ml의 농도를 갖는다. 일정한 구체예에서, 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하는 데 이용을 위한 검출 항체 및/또는 두 번째 검출 항체는 약 1 μg/ml 내지 약 3 μg/ml의 농도를 갖는다.

[0025] 일정한 구체예에서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및/또는 두 번째 포획 항체는 (a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, (b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인, (c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인, (d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인, (e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 그리고 (f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함하는 항체를 포함하거나 또는 이것에 경쟁적으로 결합한다.

[0026] 일정한 구체예에서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및/또는 두 번째 포획 항체는 (a) 서열 번호: 54, 55, 74 및 75로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고 (b) 서열 번호: 50, 51, 70 및 71로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하거나 또는 이것에 경쟁적으로 결합한다. 일정한 구체예에서, 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및/또는 두 번째 포획 항체는 (a) 서열 번호: 22, 23, 66 및 67로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고 (b) 서열 번호: 18, 19, 62 및 63으로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하거나 또는 이것에 경쟁적으로 결합한다.

[0027] 일정한 구체예에서, 검출 항체 및/또는 첫 번째 검출 항체는 (a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, (b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인, (c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인, (d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인, (e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인, 그리고 (f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함하는 항체를 포함하거나 또는 이것에 경쟁적으로 결합한다.

- [0028] 일정한 구체예에서, 검출 항체 및/또는 첫 번째 검출 항체는 (a) 서열 번호: 56, 57, 72 및 73으로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고 (b) 서열 번호: 52, 53, 68 및 69로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하거나 또는 이것에 경쟁적으로 결합한다. 일정한 구체예에서, 검출 항체 및/또는 첫 번째 검출 항체는 (a) 서열 번호: 24, 25, 64 및 65로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고 (b) 서열 번호: 20, 21, 60 및 61로 구성된 군에서 선택되는, 예를 들면, 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하거나 또는 이것에 경쟁적으로 결합한다.
- [0029] 일정한 구체예에서, 개시된 면역검정 방법에서 이용되는 항체는 단일클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 일정한 구체예에서, 개시된 면역검정 방법에서 이용되는 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다.
- [0030] 일정한 구체예에서, 분석되는 표본은 개체로부터 획득된 혈액 표본이다. 일정한 구체예에서, 표본은 개체로부터 획득된 혈장 표본이다.
- [0031] 본 발명은 단리된 항-FGF21 항체를 더욱 제공한다. 일정한 구체예에서, 단리된 항-FGF21 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 (a) 서열 번호: 26-29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; (b) 서열 번호: 30-33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인; (c) 서열 번호: 34-37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인; (d) 서열 번호: 38-41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인; (e) 서열 번호: 42-45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고 (f) 서열 번호: 46-49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0032] 일정한 구체예에서, 단리된 항-FGF21 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 (a) 서열 번호: 54-57 및 72-75로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열; 그리고 (b) 서열 번호: 50-53 및 68-71로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 단리된 항-FGF21 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 (a) 서열 번호: 22-25 및 64-67로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열; 그리고 (b) 서열 번호: 18-21 및 60-63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도면의 간단한 설명

- 도 1: 항-FGF21 항체를 발현하는 80개 하이브리도마 상층액의 ELISA 스크린의 결과를 묘사한다.
- 도 2: mAb4 또는 mAb9 포획 항체 및 mAb11 검출 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의한 무손상 대 개열된 FGF21 검출의 용량 반응을 묘사한다.
- 도 3: 항-FGF21 항체 mAb4, mAb9, mAb11 및 mAb15의 BIACORE® 표면 플라즈몬 공명 분석을 묘사한다.
- 도 4: FGF21에 항-FGF21 항체 결합을 도시하는 계통도를 묘사한다 (FGF19가 음성 대조로서 이용된다).
- 도 5: 총 FGF21 및 활성 FGF21을 검출하기 위한 비색 ELISA 방법의 무제한적 구체예의 계통도를 묘사한다.
- 도 6: 총 및 활성 FGF21 ELISA 검정을 수행하기 위한 프로토콜의 무제한적 구체예를 묘사한다.
- 도 7: mAb4 또는 mAb11 포획 항체 중에서 어느 한 가지 및 다양한 검출 항체를 이용한 ELISA 검정의 결과를 묘사한다.
- 도 8: 예시적인 총 및 활성 FGF21 ELISA 검정을 이용한, 야생형 및 개열된 인간 FGF21을 검출하는 민감도의 비교를 묘사한다.
- 도 9: 예시적인 총 FGF21 ELISA 검정을 이용한, 인간 FGF21의 검출을 묘사한다.
- 도 10: 예시적인 항-FGF21 항체가 생쥐 FGF21과 교차반응하지 않는다는 것을 지시하는 ELISA 검정을 묘사한다.

- 도 11: 예시적인 총 및 활성 FGF21 ELISA 검정에서 포획 항체 mAb4 및 mAb9의 민감도의 비교를 묘사한다.
- 도 12: 포획 항체로서 mAb4 및 검출 항체로서 mAb15를 이용한 예시적인 총 FGF21 ELISA 검정의 민감도에 대한 코트 완충액 및 농도의 효과를 묘사한다.
- 도 13: 포획 항체로서 mAb4 및 검출 항체로서 양 C 말단 pAb를 이용한 예시적인 활성 FGF21 ELISA 검정의 민감도에 대한 코트 완충액 및 농도의 효과를 묘사한다.
- 도 14: 포획 항체로서 mAb4 및 검출 항체로서 mAb15를 이용한 예시적인 총 FGF21 ELISA 검정의 민감도에 대한 비오틴-접합된 검출 항체 및 HRP 농도의 효과를 묘사한다.
- 도 15: Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™ ("Quanterix Simoa")를 이용하여 총 FGF21 및 활성 FGF21을 검출하기 위한 단일 분자 검출 방법의 무제한적 구체예의 계통도를 묘사한다.
- 도 16: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에 대한 2-단계 검정 프로토콜의 무제한적 구체예를 묘사한다.
- 도 17: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에 의한 무손상 대 개열된 FGF21 검출의 용량 반응을 묘사한다.
- 도 18: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정을 수행하기 위한 프로토콜의 무제한적 구체예를 묘사한다.
- 도 19: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정에서 표준 곡선을 묘사한다.
- 도 20: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정에서 표준 곡선 성과를 묘사한다.
- 도 21: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정에서 BA010 및 IL-12 완충액의 존재에서 총 및 활성 FGF21을 검출하는 민감도의 비교를 묘사한다.
- 도 22: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정의 민감도에 대한 높은 비드 (HB) 및 낮은 비드 (LB) 농도의 효과를 묘사한다.
- 도 23: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정에서 3개의 포획 상자성 비드 로트를 이용하여 총 및 활성 FGF21을 검출하는 민감도의 비교를 묘사한다.
- 도 24: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 총 FGF21 검정에서 다양한 검출 항체를 이용한, 총 및 활성 FGF21을 검출하는 민감도의 비교를 묘사한다.
- 도 25: Quanterix Simoa를 이용하고, 포획 항체로서 mAb4 및 검출 항체로서 mAb15를 이용한 예시적인 총 FGF21 검정에서 후크 효과의 분석을 묘사한다.
- 도 26: 예시적인 총 및 활성 FGF21 ELISA 검정을 이용한, 건강한 공여자로부터 혈장과 혈청 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출을 묘사한다.
- 도 27: 예시적인 총 및 활성 FGF21 ELISA 검정을 이용한, 고혈압성인 공여자 및 약물 치료를 받고 있지 않은 공여자로부터 혈장 표본 또는 MS-SAFE로 처리된 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출을 묘사한다.
- 도 28a: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정 (1 일자)을 이용한, 건강한 개체 및 2형 당뇨병 환자로부터 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출을 묘사한다.
- 도 28b: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정 (2 일자)을 이용한, 건강한 개체 및 2형 당뇨병 환자로부터 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출을 묘사한다.
- 도 29: Quanterix Simoa를 이용한, 건강한 개체 및 2형 당뇨병 환자로부터 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출에 이용되는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정의 재현성을 묘사한다.
- 도 30: Quanterix Simoa를 이용한, 2형 당뇨병 환자로부터 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출에 이용되는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정의 희석 선형성을 묘사한다.
- 도 31: Quanterix Simoa를 이용한, 2형 당뇨병 환자로부터 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출에 이용되는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정에서 최저 정량 한계 (LLOQ)의 결정을 묘사한다.

도 32: Quanterix Simoa를 이용한, 2형 당뇨병 환자로부터 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출에 이용되는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정의 특이성을 묘사한다.

도 33: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정을 이용한, P800 또는 K₂-EDTA를 이용하여 준비된 혈장 표본에서 총 FGF21 및 활성 FGF21의 검출을 묘사한다.

도 34: Quanterix Simoa를 이용한 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정에서 GC29819 연구로부터 P800 및 K₂-EDTA 혈장 표본에서 검출되는 총 FGF21 및 활성 FGF21의 분석을 묘사한다.

도 35: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 총 FGF21 검정을 이용하여 정량된 P800 및 K₂-EDTA 혈장 표본(GC29819 임상 연구)에서 검출되는 총 FGF21 및 활성 FGF21의 양 사이에 상관을 묘사한다.

도 36: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 활성 FGF21 검정을 이용하여 정량되는 P800 및 K₂-EDTA 혈장 표본(GC29819 연구)에서 검출되는 총 FGF21 및 활성 FGF21의 양 사이에 상관을 묘사한다.

도 37: Quanterix Simoa를 이용하는 예시적인 총 및 활성 FGF21 검정을 이용한 GC29819 연구로부터 P800 혈장 표본의 안정성의 평가를 묘사한다.

도 38: Quanterix Simoa를 이용한 총 및 활성 검정에 대한 10 µg/ml의 생쥐 또는 양 IgG를 내포하는 검정 희석제의 효과를 묘사한다.

도 39: Quanterix Simoa를 이용한 총 및 활성 검정에 대한 10 µg/ml의 생쥐 및 양 IgG를 내포하는 검정 희석제의 효과를 묘사한다.

도 40: Quanterix Simoa를 이용한 총 및 활성 검정에서 표준 곡선에 대한 10 µg/ml의 생쥐 또는 양 IgG를 내포하는 검정 희석제의 효과를 묘사한다.

도 41a: 예시적인 항-FGF21 항체의 경쇄 가변 영역의 서열을 묘사한다. 경쇄 가변 영역 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 50, 51, 52, 53, 71, 70, 69 및 68로서 개시된다. CDR-L1 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 38, 39, 40, 41, 38, 39, 40 및 41로서 개시되고; CDR-L2 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 42, 43, 44, 45, 42, 43, 44 및 45로서 개시되고; 그리고 CDR-L3 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 46, 47, 48, 49, 46, 47, 48 및 49로서 개시된다.

도 41b: 예시적인 항-FGF21 항체의 중쇄 가변 영역의 서열을 묘사한다. 중쇄 가변 영역 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 54, 55, 56, 57, 75, 74, 73 및 72로서 개시된다. CDR-H1 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 26, 27, 28, 29, 26, 27, 28 및 29로서 개시되고; CDR-H2 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 30, 31, 32, 33, 30, 31, 32 및 33으로서 개시되고; 그리고 CDR-H3 서열은 각각, 등장 순서로 서열 번호: 34, 35, 36, 37, 34, 35, 36 및 37로서 개시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

명료함을 위해, 하지만 제한 없이, 본원에서 개시된 요부의 상세한 설명은 하기의 하위섹션으로 나뉜다:

I. 정의;

II. 면역검정;

III. 항체;

IV. 키트; 그리고

V. 예시적인 구체예.

I. 정의

별도로 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 다음의 참고문헌은 본 발명에서 이용된 많은 용어의 일반적인 정의를 당업자에게 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The

Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 그리고 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에서 이용된 바와 같이, 하기 용어는 별도로 명시되지 않으면, 아래에서 그들에 생득된 의미를 갖는다.

- [0043] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "약" 또는 "대약"은 당업자에 의해 결정될 때 특정 값에 대한 허용되는 오차 범위 이내를 의미할 수 있는데, 이것은 상기 값이 어떻게 측정되거나 또는 결정되는 지, 예를 들면, 측정 시스템의 제한에 부분적으로 의존할 것이다. 예를 들면, "약"은 소정의 값에서 관례에 따라, 1 이내 또는 1보다 큰 표준 편차를 의미할 수 있다. 특정 값이 출원 및 청구항에서 설명되는 경우에, 별도로 명시되지 않으면, 용어 "약"은 특정 값에 대한 허용되는 오차 범위, 예컨대, 용어 "약"에 의해 수식된 값의 $\pm 10\%$ 를 의미할 수 있다.
- [0044] 본원에서 교체가능하게 이용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형이거나 또는 분지될 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 그리고 비-아미노산이 끼어 들 수 있다. 이들 용어는 또한, 자연적으로 또는 개입에 의해; 예를 들면, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지화 성분으로 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다. 또한, 상기 정의 내에는 예를 들면, 아미노산의 하나 또는 그 이상의 유사체 (예를 들면, 비자연적인 아미노산 등 포함)뿐만 아니라 당해 분야에서 공지된 다른 변형을 내포하는 폴리펩티드가 포함된다. 본원에서 이용된 바와 같이 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 항체를 특이적으로 포괄한다.
- [0045] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "섬유모세포 성장 인자 21" 또는 "FGF21"는 별도로 지시되지 않으면, 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들면, 인간) 및 설치류 (예를 들면, 생쥐 및 쥐)를 비롯한, 임의의 척추동물 공급원으로부터 임의의 선천적 FGF21을 지칭한다. 상기 용어는 "전장," 처리되지 않은 FGF21뿐만 아니라 세포에서 처리로부터 발생하는 임의의 형태의 FGF21을 포괄한다. 상기 용어는 또한, 별도로 지시되지 않으면 FGF21의 자연발생 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포괄한다. 전장 인간 FGF21 아미노산의 무제한적 실례는 하기에 도시된다:
- [0046] HPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLED GYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDPLSMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 1).
- [0047] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "총 FGF21"은 FGF21의 처리되지 않은 형태뿐만 아니라 세포 처리로부터 발생하는 FGF21의 모든 형태, 예를 들면, N 말단 개열된 FGF21 및 C 말단 개열된 FGF21을 포함한다. 10개의 C 말단 아미노산을 결여하는 인간 FGF21 아미노산의 무제한적 실례는 하기이다:
- [0048] HPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLED GYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDPLSMVG (서열 번호: 58). 4개의 N 말단 아미노산을 결여하는 인간 FGF21 아미노산의 무제한적 실례는 하기이다:
- [0049] DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDPLSMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 59). 예를 들면, 하지만 제한 없이, 용어 "총 FGF21"은 서열 번호: 1, 서열 번호: 58 또는 서열 번호: 59에서 진술된 아미노산 서열을 갖는 FGF21 단백질을 포함한다.
- [0050] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "활성 FGF21"은 C 말단 단편을 유지하는 FGF21 단백질을 지칭한다. 일정한 구체에서, 상기 용어는 FGF21의 처리된 형태, 예컨대 FGF21의 N 말단 단편, 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 잔기 1-4가 개열된 것들을 포함한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 용어 "활성 FGF21"은 서열 번호: 1에서 진술된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 59에서 진술된 아미노산 서열을 갖는 FGF21 단백질을 포함한다.
- [0051] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 이용되고, 그리고 원하는 항원 결합 활성을 전사하기만 하면, 단일 클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체) 및 항체 단편을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.
- [0052] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 부분을 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 실례는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자 (예를 들면, scFv); 그리고 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0053] 관심되는 항원, 예를 들면, FGF21 단백질에 "결합하는" 항체는 상기 항체가 검정 시약으로서, 예컨대 포획 항체로서 또는 검출 항체로서 유용할 만큼 충분한 친화성으로 항원에 결합하는 항체이다. 전형적으로, 이런 항체는

다른 폴리펩티드와 유의미하게 교차반응하지 않는다. 표적 분자에 폴리펩티드의 결합에 대하여, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상에서 에피토프에 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적이다"는 비특이적 상호작용과 계측가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은 예를 들면, 일반적으로 결합 활성을 갖지 않는 유사한 구조의 분자인 대조 분자의 결합과 비교하여 표적 분자의 결합을 결정함으로써 계측될 수 있다.

[0054] 용어 "항-FGF21 항체"는 항체가 FGF21을 표적화하는 작용제로서, 예를 들면, 본원에서 설명된 검정에서 작용제로서 유용할 만큼 충분한 친화성으로 FGF21에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 일정한 구체예에서, 관련 없는 비-FGF21 단백질에 항-FGF21 항체의 결합의 정도는 예를 들면, 방사면역검정 (RIA)에 의해 계측될 때 FGF21에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%보다 적다. 일정한 구체예에서, FGF21에 결합하는 항체는 $\leq 1 \text{ M}$, $\leq 100 \text{ mM}$, $\leq 10 \text{ mM}$, $\leq 1 \text{ mM}$, $\leq 100 \text{ }\mu\text{M}$, $\leq 10 \text{ }\mu\text{M}$, $\leq 1 \text{ }\mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ 의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된, FGF21에 결합하는 항체의 K_d 는 10^{-3} M 또는 그 이하 또는 10^{-8} M 또는 그 이하, 예를 들면, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들면, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M 일 수 있다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된, FGF21에 결합하는 항체의 K_d 는 10^{-10} M 내지 10^{-13} M 일 수 있다. 일정한 구체예에서, 항-FGF21 항체는 상이한 종으로부터 FGF21 사이에서 보존되는, FGF21의 에피토프에 결합한다.

[0055] 본원에서 목적으로 "수용자 인간 프레임워크"는 아래에 규정된 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 이것은 아미노산 서열 변화를 내포할 수 있다. 일정한 구체예에서, 아미노산 변화의 숫자는 10 또는 그 이하, 9 또는 그 이하, 8 또는 그 이하, 7 또는 그 이하, 6 또는 그 이하, 5 또는 그 이하, 4 또는 그 이하, 3 또는 그 이하, 또는 2 또는 그 이하이다. 일정한 구체예에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 서열에서 동일하다.

[0056] "친화성"은 분자 (예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 상대 (예를 들면, 항원) 사이에 비공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 별도로 지시되지 않으면, 본원에서 이용된 바와 같이, "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원 (예를 들면, 항체와 항원) 사이에 1:1 상호작용을 반영하는 내재성 결합 친화성을 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로, 해리 상수 (K_d)에 의해 표현될 수 있다. 친화성은 본원에서 설명된 것들을 비롯한, 당해 분야에서 공지된 통상적인 방법에 의해 계측될 수 있다. 결합 친화성을 계측하기 위한 특정한 예시적이고 전형적인 구체예는 하기에서 설명된다.

[0057] "친화성 성숙된" 항체는 변형을 갖지 않는 부모 항체와 비교하여, 하나 또는 그 이상의 초가변 영역 (CDRs)에서 한 가지 또는 그 이상의 변형을 갖는 항체를 지칭하는데, 이런 변형은 항원에 대한 항체의 친화성에서 향상을 유발한다.

[0058] 참조 항체와 "결합에 대해 경쟁하는 항체"는 경쟁 검정에서 항원에 대한 참조 항체의 결합을 50% 또는 그 이상 차단하는 항체를 지칭하고, 그리고 반대로, 참조 항체는 경쟁 검정에서 항원에 대한 항체의 결합을 50% 또는 그 이상 차단한다. 예시적인 경쟁 검정은 "Antibodies," Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)에서 설명된다.

[0059] 본원에서 이용된 바와 같이, "포획 항체"는 표본 내 표적 분자, 예를 들면, FGF21의 형태에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 일정한 조건 하에, 포획 항체는 항체-표적 분자 복합체가 표본의 나머지 부분으로부터 분리될 수 있도록, 표적 분자와 복합체를 형성한다. 일정한 구체예에서, 이런 분리는 포획 항체에 결합하지 않은, 표본 내 물질 또는 재료를 씻어내는 것을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 포획 항체는 고체 지지체 표면, 예컨대, 예를 들면 하지만 제한 없이, 평판 또는 비드, 예를 들면, 상자성 비드에 부착될 수 있다.

[0060] 본원에서 이용된 바와 같이, "검출 항체"는 표본 내 또는 표본-포획 항체 조합 물질 내에서 표적 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 일정한 조건 하에, 검출 항체는 표적 분자 또는 표적 분자-포획 항체 복합체와 복합체를 형성한다. 검출 항체는 증폭될 수 있는 표지를 통해 직접적으로, 또는 예를 들면, 표지화되고 검출 항체에 결합하는 다른 항체의 이용을 통해 간접적으로 검출될 수 있다. 직접적인 표지화의 경우에, 검출 항체는 전형적으로, 일부 수단, 예를 들면, 비오틴 또는 루테늄을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 수단에 의해 검출

가능한 모이어티에 접합된다.

- [0061] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 공급원 또는 종으로부터 유래되고, 반면 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분이 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다.
- [0062] 항체의 "부류"는 이의 중쇄에 의해 소유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 그리고 이들 중에서 몇몇은 하위부류 (아이소타입), 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 더욱 나뉘질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각, α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다.
- [0063] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "세포독성 작용제"는 세포 기능을 저해하거나 또는 예방하고 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성 작용제는 방사성동위원소 (예를 들면, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사성동위원소); 화학요법 작용제 또는 약물 (예를 들면, 메토폭사트, 아드리아마이신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입 작용제); 성장 저해제; 효소 및 이들의 단편, 예컨대 핵산분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 소형 분자 독소, 또는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성 독소뿐만 아니라 이들의 단편 및/또는 변이체; 그리고 아래에 개시된 다양한 항종양 또는 항암 작용제를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0064] "작용제 기능"은 항체의 Fc 영역에 기인한 생물학적 활성을 지칭하는데, 이들은 항체 아이소타입에 따라서 변한다. 항체 작용제 기능의 실례는 다음을 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들면, B 세포 수용체)의 하향조절; 그리고 B 세포 활성화.
- [0065] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 내포하는, 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 규정하는데 이용된다. 상기 용어는 선천적 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일정한 구체예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 중쇄의 Cys226으로부터 또는 Pro230으로부터 카르복실 말단까지 확장된다. 하지만, Fc 영역의 C 말단 리신 (Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 별도로 특정되지 않으면, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에서 설명된 바와 같이, EU 색인으로 또한 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다.
- [0066] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (CDR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 구성된다. 따라서, CDR과 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기의 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0067] 용어 "전장 항체," "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 선천적 항체 구조와 실제로 유사한 구조를 갖는 또는 본원에서 규정된 바와 같은 Fc 영역을 내포하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 교체가능하게 이용된다.
- [0068] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 활용하는 비인간 공급원로부터 유래된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 소유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 특정적으로 배제한다.
- [0069] "인간 공통 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별에서 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선별된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), Vols. 1-3의 경우에 서와 같은 하위군이다. 일정한 구체예에서, VL의 경우에, 하위군은 Kabat et al., *위와 같음*의 경우에서와 같은 하위군 카파 I이다. 일정한 구체예에서, VH의 경우에, 하위군은 Kabat et al., *위와 같음*의 경우에서와 같은 하위군 III이다.
- [0070] "인간화" 항체는 비인간 CDRs로부터 아미노산 잔기 및 인간 FRs로부터 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 일정한 구체예에서, 인간화 항체는 적어도 하나, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실제로 모두 포함할 것인데, 여기서 CDRs (예를 들면, CDRs)의 전부 또는 실제로 전부가 비인간 항체의 것들에 상응하고, 그리고 FRs의 전부 또는 실제로 전부가 인간 항체의 것들에 상응한다. 인간화 항체는 임의적으로,

인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역 중에서 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들면, 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.

- [0071] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "초가변 영역" 또는 "CDR"은 서열에서 초가변성 (본원에서 "상보성 결정 영역" 또는 "CDRs"로서 또한 지칭됨)이고 및/또는 구조적으로 규정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하고 및/또는 항원 접촉 잔기 ("항원 접촉")를 내포하는, 항체 가변 도메인의 각 영역을 지칭한다. 별도로 지시되지 않으면, CDR 잔기 및 가변 도메인에서 다른 잔기 (예를 들면, FR 잔기)는 본원에서 Kabat et al., *위와 같음*에 따라서 넘버링된다. 일반적으로, 항체는 6개의 CDRs; VH에서 3개 (H1, H2, H3), 그리고 VL에서 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 본원에서 예시적인 CDRs는 하기를 포함한다:
- [0072] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 그리고 96-101 (H3)에서 발생하는 초가변 루프 (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));
- [0073] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 그리고 95-102 (H3)에서 발생하는 CDRs (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
- [0074] (c) 아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 그리고 93-101 (H3)에서 발생하는 항원 접촉 (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); 그리고
- [0075] (d) CDR 아미노산 잔기 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), 그리고 94-102 (H3)를 비롯한, (a), (b) 및/또는 (c)의 조합.
- [0076] "면역접합체"는 세포독성 작용제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 한 가지 또는 그 이상의 이종성 분자(들)에 접합된 항체를 지칭한다.
- [0077] "단리된" 항체는 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 것이다. 일정한 구체예에서, 항체는 예를 들면, 전기 이동 (예를 들면, SDS-PAGE, 등전위 초점 (IEF), 모세관 전기이동) 또는 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정될 때, 95% 또는 99% 이상의 순도로 정제된다. 항체 순도의 사정을 위한 방법에 관한 리뷰를 위해, 예를 들면, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)을 참조한다.
- [0078] "단리된" 핵산은 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산에는 핵산 분자를 통상적으로 내포하는 세포에 내포된 핵산 분자가 포함되지만, 상기 핵산 분자는 염색체외에 또는 자연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0079] "항체를 인코딩하는 단리된 핵산" (특이적 항체, 예를 들면, 항-FGF21 항체에 대한 참조 포함)은 항체 중쇄와 경쇄를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 핵산 분자 (또는 이들의 단편), 단일 벡터 또는 별개의 벡터에서 이런 핵산 분자(들), 그리고 숙주 세포 내에 하나 또는 그 이상의 위치에서 존재하는 이런 핵산 분자(들)를 지칭한다.
- [0080] 본원에서 이용된 바와 같이 용어 "단일클론 항체"는 실제로 균질한 항체의 개체군으로부터 획득된 항체를 지칭한다. 다시 말하면, 상기 개체군을 구성하는 개별 항체는 예를 들면, 자연발생 돌연변이를 내포하거나 또는 단일클론 항체 제조물의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체 (이런 변이체는 일반적으로 미량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고 및/또는 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정인자 (에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 단일클론 항체 제조물의 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 항체의 실제로 균질한 개체군으로부터 획득되는 것으로서 항체의 특징을 지시하고, 그리고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 본원에서 개시된 요부에 따라서 이용되는 단일클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지 전사 방법, 그리고 인간 면역글로불린 좌위 중에서 전부 또는 일부를 내포하는 유전자도입 동물을 활용하는 방법을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있는데, 이런 방법 및 단일클론 항체를 만들기 위한 다른 예시적인 방법은 본원에서 설명된다.
- [0081] "나신 항체"는 이종성 모이어티 (예를 들면, 세포독성 모이어티) 또는 방사성 표지에 접합되지 않는 항체를 지칭한다. 나신 항체는 제약학적 제제 내에 존재할 수 있다.
- [0082] "선천적 항체"는 변하는 구조를 갖는 자연발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들면, 선천적 IgG 항체는 디설피드 결합되는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성되는, 약 150,000 달톤의 이종삼합체성 당단백질이다. N 말단으로부터 C 말단으로, 각 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로 또한 불리는 가

변 영역 (VH), 그 이후에 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N 말단으로부터 C 말단으로, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 또한 불리는 가변 영역 (VL), 그 이후에 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ) 로 불리는 2가지 유형 중에서 한 가지에 배정될 수 있다.

[0083] 본원에서 이용된 바와 같이, "정제된" 폴리펩티드 (예를 들면, 항체)는 폴리펩티드가 이의 자연 환경에서 존재하는 것보다 더욱 순수한 형태로 존재하도록 및/또는 초기에 합성되고 및/또는 실험실 조건 하에 증폭될 때 순도가 증가된 폴리펩티드를 지칭한다. 순도는 상대적 용어이고 반드시 절대 순도를 의미하는 것은 아니다.

[0084] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "포장 삽입물"은 포장의 구성요소의 이용에 관한 정보를 내포하는 상업적인 포장 내에 관례적으로 포함되는 사용설명서를 지칭한다.

[0085] 참조 폴리펩티드 서열에 대하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 최고 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 필요하면, 갭을 도입한 후에, 그리고 임의의 보존성 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 참조 폴리펩티드 서열 내에 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열 내에 아미노산 잔기의 백분율로서 규정된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당해 분야의 기술 범위 안에 있는 다양한 방식으로, 예를 들면, 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 하지만, 본원에서 목적을 위해, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 산출된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 저술되었고, 그리고 소스 코드가 사용자 문서로 U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559에 제출되었는데, 여기서 이것은 U.S. Copyright 등록 번호 TXU510087 하에 등록된다. ALIGN-2 프로그램은 Genentech, Inc., South San Francisco, California로부터 공개적으로 가용하거나, 또는 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 비롯한 UNIX 운영 체제에서 이용을 위해 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 세팅되고 변하지 않는다.

[0086] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 이용되는 상황에서, 소정의 아미노산 서열 B에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (이것은 대안으로, 소정의 아미노산 서열 B에 대해 일정한 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 또는 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 아래와 같이 계산된다:

[0087] 100 곱하기 분율 X/Y

[0088] 여기서 X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해, 상기 프로그램의 A와 B의 정렬에서 동일한 정합으로서 채점된 아미노산 잔기의 숫자이고, 그리고 여기서 Y는 B에서 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우에, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않을 것으로 인지될 것이다. 별도로 특정되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 직전 단락에서 설명된 바와 같이 획득된다.

[0089] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 데 관련되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 선천적 항체의 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 (각각, VH와 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖는데, 각 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FRs) 및 3개의 초가변 영역 (CDRs)을 포함한다. (참조: 예를 들면, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) 단일 VH 또는 VL 도메인이 항원 결합 특이성을 부여하는 데 충분할 수 있다. 게다가, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각, 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 선별검사하기 위해, 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 이용하여 단리될 수 있다. 참조: 예를 들면, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0090] 본원에서 교체가능하게 이용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양액"은 외인성 핵산이 도입된 세포 및 이런 세포의 자손을 지칭한다. 숙주 세포에는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"가 포함되는데, 이들은 계대 (passage)의 횟수에 상관없이, 일차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량에서 부모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있고, 돌연변이를 내포할 수도 있다. 최초 형질전환된 세포에 대해 선별검사되거나 또는 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손은 본원에 포함된다.

[0091] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "백터"는 자신이 연관되는 다른 핵산을 증식할 수 있는 핵산 분자를

포함한다. 상기 용어는 자가-복제 핵산 구조로서 벡터뿐만 아니라 이것이 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 삽입된 벡터를 포함한다. 일정한 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 핵산의 발현을 주동할 수 있다. 이런 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

[0092] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "표지" 또는 "검출가능한 표지"는 검출되거나 또는 정량되는 물질, 예를 들면, 항체에 연결될 수 있는 임의의 화학적 기 또는 모이어티를 지칭한다. 표지는 물질의 민감한 검출 또는 정량에 적합한 검출가능한 표지이다. 검출가능한 표지의 무제한적 실례는 발광 표지, 예를 들면, 형광, 인광성, 화학발광, 생물발광 및 전기화학발광 표지, 방사성 표지, 효소, 입자, 자성 물질, 전기활성 종류 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 대안으로, 검출가능한 표지는 특이적 결합 반응에 참여함으로써 자신의 존재를 신호할 수도 있다. 이런 표지의 무제한적 실례는 합텐, 항체, 비오틴, 스트렙타비딘, his-태그, 니트릴로트리아세트산, 글루타티온 S-전달효소, 글루타티온 등을 포함한다.

[0093] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "검출 수단"은 신호 리포팅을 통해 검출가능한 항체의 존재를 검출하는 데 이용된 모이어티 또는 기술을 지칭하고, 상기 리포팅은 이후, 검정에서 판독된다. 전형적으로, 검출 수단은 고정된 표지, 예컨대 마이크로역가 평판 위에 포획된 표지를 증폭하는 시약, 예를 들면, 검출 작용제, 예를 들면, 아비딘, 스트렙타비딘-HRP 또는 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스를 이용한다.

[0094] 본원에서 용어 "검출하는"은 표적 분자, 예를 들면, FGF21 또는 이의 처리된 형태의 정성적 및 정량적 계측 둘 모두를 포함하는 데 이용된다. 일정한 구체예에서, 검출하는 것은 표본 내 표적 분자의 존재를 단순히 확인하는 것뿐만 아니라 표적 분자가 표본 내 검출가능한 수준으로 존재하는 지를 결정하는 것을 포함한다.

[0095] 본원에서 교체가가능하게 이용된 바와 같이, "개체" 또는 "피험자"는 포유동물이다. 포유동물은 순치된 동물 (예를 들면, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들면, 인간 및 비인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼, 그리고 설치류 (예를 들면, 생쥐 및 쥐)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 구체예에서, 개체 또는 피험자는 인간이다.

[0096] 본원에서 이용된 바와 같이, "표본"은 더욱 많은 양의 물질의 작은 부분을 지칭한다. 일정한 구체예에서, 표본은 배양 중인 세포, 세포 상층액, 세포 용해물, 혈청, 혈액 혈장, 생물학적 유체 (예를 들면, 혈액, 혈장, 혈청, 대변, 소변, 림프액, 복수, 도관 세척액, 타액 및 뇌척수액) 및 조직 표본을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 표본의 공급원은 고정 조직 (예를 들면, 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기, 조직 표본, 생검 또는 흡인물로부터), 혈액 또는 임의의 혈액 성분, 체액 (예컨대, 예를 들면, 소변, 림프, 뇌척수액, 양수, 복막액 또는 사이질액), 또는 순환성 세포를 비롯한, 개체로부터 세포일 수 있다.

[0097] II. 면역검정

[0098] 본원에서 개시된 요부는 FGF21 단백질의 검출과 정량을 위한 방법을 제공한다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 표본 내 총 FGF21 및/또는 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정을 제공한다. 본 발명은 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 면역검정 방법을 더욱 제공한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 면역검정 방법은 본원에서 개시된 항-FGF21 항체를 이용한다. 본원에서 개시된 방법에서 이용을 위한 항-FGF21 항체의 무제한적 실례는 표 8-13 및 16-19에서 제공된다.

[0099] 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 FGF21 단백질의 검출과 정량을 위한 면역검정 방법을 제공한다. 예를 들면, 면역검정 방법은 표본 내 FGF21, 예를 들면, 총 인간 FGF21 및/또는 활성 인간 FGF21 단백질의 검출과 정량에 이용될 수 있다. 본 발명의 면역검정 방법은 샌드위치 검정, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA) 검정, ELISA의 디지털 형태, 전기화학적 검정 (ECL) 검정 및 자성 면역검정을 포함하지만 이들에 한정되지 않는, 당해 분야에서 공지된 전략을 통합할 수 있다. 일정한 구체예에서, 면역검정 방법은 예를 들면, 단일 분자 어레이를 이용한 단일 분자 면역검정이다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 면역검정 방법은 Quanterix 기기, 예를 들면, Simoa HD-1 Analyzer™를 이용하여 수행될 수 있다.

[0100] 일정한 구체예에서, 본 발명의 방법은 표본 내 FGF21 단백질에 포획 항-FGF21 항체의 결합을 허용하는 조건 하에, 개체로부터 획득된 표본을 포획 항-FGF21 항체, 예컨대 본원에서 설명된 것들과 접촉시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 표본은 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하기 위해, FGF21 상에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체와 함께 배양될 수 있다. 표본 및 포획 항체의 배양을 위한 조건은 검정의 민감도를 최대화하고 및/또는 해리를 최소화할 뿐만 아니라 표본 내 존재하는 FGF21 단백질이 포획 항체에 결합하는 것을 담보하도록 선별될 수 있다.

[0101] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 면역검정 방법에서 이용되는 포획 항체는 약 0.1 μg/ml 내지 약 5.0 μ

g/ml의 농도에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 포획 항체는 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 4.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 예를 들면, 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이용될 수 있다.

[0102] 일정한 구체예에서, 포획 항체는 코팅 완충액에서 희석될 수 있다. 코팅 완충액의 무제한적 실례는 PBS, 탄산염 완충액, 중탄산염 완충액 또는 이들의 조합을 포함한다. 일정한 구체예에서, 코팅 완충액은 중탄산나트륨이다. 일정한 구체예에서, 코팅 완충액은 PBS이다. 일정한 구체예에서, 코팅 완충액은 약 10 mM 내지 약 1 M의 농도에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 코팅 완충액은 약 10 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 200 mM, 약 10 mM 내지 약 300 mM, 약 10 mM 내지 약 400 mM, 약 10 mM 내지 약 500 mM, 약 10 mM 내지 약 600 mM, 약 10 mM 내지 약 700 mM, 약 10 mM 내지 약 800 mM, 약 10 mM 내지 약 900 mM, 약 100 mM 내지 약 1 M, 약 200 mM 내지 약 1 M, 약 300 mM 내지 약 1 M, 약 400 mM 내지 약 1 M, 약 500 mM 내지 약 1 M, 약 600 mM 내지 약 1 M, 약 700 mM 내지 약 1 M, 약 800 mM 내지 약 1 M 또는 약 900 mM 내지 약 1 M의 농도에서 이용될 수 있다.

[0103] 본원에서 이용된 바와 같이, 포획 항체는 고체상 위에 고정될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 고체상은 예를 들면, 표면, 입자, 다공성 매트릭스, 비드 등의 형태에서 지지체를 비롯하여, 면역계측 검정에서 유용한 임의의 비활성 지지체 또는 운반체일 수 있다. 통상적으로 이용되는 지지체의 무제한적 실례는 작은 시트, SEPHADEX®, 겔, 폴리염화비닐, 플라스틱 비드, 그리고 96 웰 마이크로역가 평판을 비롯하여, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌 등으로부터 제조된 검정 평판 또는 시험관뿐만 아니라 미립자 물질, 예컨대 필터 페이퍼, 아가로오스, 교차연결된 텍스트란 및 다른 다당류를 포함한다. 일정한 구체예에서, 고정에 이용되는 고체상은 비드일 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본원에서 개시된 포획 항체는 상자성 비드에 고정된다. 일정한 구체예에서, 고정된 포획 항체는 여러 표본을 한꺼번에 분석하는 데 이용될 수 있는 마이크로역가 평판 위에 코팅된다.

[0104] 일정한 구체예에서, 포획 항체에 연계된 상자성 비드는 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 예를 들면, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 0.5×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 1.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 2.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 3.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 4.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 5.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 6.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 7.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 8.0×10^7 비드/ml, 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 9.0×10^7 비드/ml, 약 0.5×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 1.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 2.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 3.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 4.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 5.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 6.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 7.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 8.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 9.0×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml, 약 0.5×10^7 비드/ml 내지 약 1.0×10^7 비드/ml, 약 0.5×10^7 비드/ml 내지 약 2.0×10^7 비드/ml 또는 약 0.5×10^7 비드/ml 내지 약 3.0×10^7 비드/ml의 농도에서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 상자성 비드는 약 0.5×10^7 비드/ml 내지 약 2.0×10^7 비드/ml의 농도에서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 상자성 비드는 약 1.0×10^7 비드/ml, 예를 들면, 약 1.22×10^7 비드/ml의 농도에서, 또는 약 0.5×10^7 비드/ml, 예를 들면, 약 0.59×10^7 비드/ml의 농도에서 이용될 수 있다.

[0105] 본원에서 개시된 면역검정 방법은 표본-포획 항체 조합 물질을 검출 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 검출 항체는 FGF21 상에 존재하는 에피토프에 결합한다. 일정한 구체예에서, 검출 항체는 표본-포획 항체 조합 물질 상에 존재하지만, FGF21의 부재에서 포획 항체 상에 존재하지 않는 에피토프에

결합한다. 일정한 구체예에서, 표본-포획 항체 조합에 결합된 검출 항체는 차후에, 검출 항체에 의해 결합된 FGF21 단백질, 예를 들면, 총 FGF21 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위해 검출 항체에 대한 검출 수단, 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 검출 작용제를 이용하여 측정되거나 또는 정량된다.

[0106] 일정한 구체예에서, 검출 항체는 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 검출 항체는 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 4.5 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 총 FGF21 단백질을 검출하기 위한 면역검정은 약 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 예를 들면, 약 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 사이의 농도에서 검출 항체를 이용할 수 있다. 일정한 구체예에서, 활성 FGF21 단백질을 검출하기 위한 면역검정은 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 예를 들면, 약 1.1 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 2.1 $\mu\text{g/ml}$ 사이의 농도에서 검출 항체를 이용할 수 있다.

[0107] 일정한 구체예에서, 개시된 방법에서 이용을 위한 항-FGF21 항체는 표지화될 수 있다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티, 예컨대 형광, 색소생산, 전자 밀도, 화학발광 및 방사성 표지뿐만 아니라 예를 들면, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 표지의 무제한적 실례는 염료 전구체를 산화시키는 과산화수소를 이용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토펙시다아제 또는 마이크로펙시다아제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정된 유리 라디칼 등과 연계된 방사성 동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시페라아제, 예를 들면, 개똥벌레 루시페라아제 및 세균 루시페라아제 (참조: U.S. 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프타라진디온, 양고추냉이 과산화효소 (HRP), 알칼리 인산분해효소, β -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다아제, 예를 들면, 글루코오스 옥시다아제, 갈락토오스 옥시다아제 및 글루코오스-6-인산염 탈수소효소, 헤테로환상 옥시다아제, 예컨대 요산분해효소 및 크산틴 옥시다아제를 포함한다. 일정한 구체예에서, 검출 항체는 비오틴으로 표지화된다, 예를 들면, 검출 항체는 비오틴에 접합된다.

[0108] 일정한 구체예에서, 비오틴화된 검출 항체에 대한 검출 작용제는 아비딘, 스트렙타비딘-HRP 또는 스트렙타비딘- β -D-갈락토피라노오스 (SBG)이다. 일정한 구체예에서, 검출 작용제의 판독은 형광측정 또는 비색이다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 테트라메틸벤지딘 및 과산화수소가 판독으로서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 만약 검출 작용제가 스트렙타비딘-HRP이면, 판독은 테트라메틸벤지딘 및 과산화수소를 이용함으로써 비색될 수 있다. 대안으로, 일정한 구체예에서, 레조루핀 β -D-갈락토피라노시드가 판독으로서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 만약 검출 작용제가 SBG이면, 판독은 레조루핀 β -D-갈락토피라노시드를 이용함으로써 형광측정될 수 있다.

[0109] 일정한 구체예에서, 검출 작용제, 예를 들면, SBG는 약 50 내지 약 500 pM의 농도에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 검출 작용제는 약 50 내지 약 100 pM, 약 50 내지 약 150 pM, 약 50 내지 약 200 pM, 약 50 내지 약 250 pM, 약 50 내지 약 300 pM, 약 50 내지 약 350 pM, 약 50 내지 약 400 pM, 약 50 내지 약 450 pM, 약 100 내지 약 500 pM, 약 150 내지 약 500 pM, 약 200 내지 약 500 pM, 약 250 내지 약 500 pM, 약 300 내지 약 500 pM, 약 350 내지 약 500 pM, 약 400 내지 약 500 pM, 약 450 내지 약 500 pM, 약 100 내지 약 400 pM 또는 약 200 내지 약 400 pM의 농도에서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 검출 작용제는 약 100 pM 내지 약 400 pM의 농도에서 이용될 수 있다, 예를 들면, SBG가 약 110 pM, 약 155 pM 또는 약 310 pM의 농도에서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, SBG는 약 310 pM의 농도에서 이용된다. 일정한 구체예에서, 검출 작용제, 예를 들면, HRP는 약 1/10 내지 약 1/1000의 희석액에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 검출 작용제는 약 1/10 내지 약 1/100, 약 1/10 내지 약 1/500, 약 1/100 내지 약 1/1000 또는 약 1/500 내지 약 1/1000의 희석액에서 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 검출 작용제는 약 1/100 내지 약 1/1000의 희석액에서 이용될 수 있다, 예를 들면, HRP가 약 1/100 또는 약 1/500의 희석액에서 이용될 수 있다.

[0110] 일정한 구체예에서, 본 발명의 방법은 포획 항체를 차단 완충액으로 차단하는 것을 포함할 수 있다. 일정한 구

체에서, 차단 완충액은 PBS, 소 혈청 알부민 (BSA) 및/또는 살생물제, 예를 들면, ProClin™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 복수의 세척 단계를 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 세척에 이용되는 용액은 일반적으로 완충액 (예를 들면, "세척 완충액"), 예컨대, 하지만 제한 없이, 세정제, 예를 들면, Tween 20을 포함하는 PBS 완충액이다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 포획 항체는 차단 후 세척될 수 있고 및/또는 표본은 예를 들면, 세척에 의해 포획 항체로부터 분리되어 포획되지 않은 물질이 제거될 수 있다.

[0111] 본 발명의 면역검정 방법은 일정한 구체예에서, 예를 들면, FGF21의 전장 및 처리된 형태를 검출함으로써, 표본 내 총 FGF21 단백질의 양을 검출하는 데 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 총 FGF21 단백질의 검출을 위한 면역검정 방법은 FGF21의 아미노산 잔기 5-172, 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 하나 또는 그 이상의 항체를 이용할 수 있다. 일정한 구체예에서, 포획 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 항체이고, 그리고 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 항체이다. 일정한 구체예에서, 포획 항체 및 검출 항체는 동일한 항체이고, 반면 다른 구체예에서, 포획 항체 및 검출 항체는 상이한 항체이지만 둘 모두 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합한다. 일정한 구체예에서, 포획 항체 및 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 포획 항체 및 검출 항체는 중첩되지 않는, FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 에피토프에 결합한다. 일정한 구체예에서, 포획 항체 및 검출 항체는 부분적으로 중첩되는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 에피토프에 결합한다.

[0112] 일정한 구체예에서, 표본 내 총 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정은 (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계; (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계; (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계; 그리고 (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.

[0113] 일정한 구체예에서, 본 발명의 면역검정 방법은 예를 들면, C 말단 단편을 유지하는 FGF21 단백질을 검출함으로써, 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 검출하는 데 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 총 FGF21 단백질의 검출을 위한 면역검정 방법은 FGF21의 아미노산 잔기 173-182, 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 하나 또는 그 이상의 항체, 그리고 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 하나 또는 그 이상의 항체를 이용할 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 활성 FGF21 단백질의 양을 검출하기 위한 면역검정 방법은 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체 및 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체를 이용할 수 있다. 일정한 구체예에서, FGF21의 아미노산 잔기 173-182에 결합하는 검출 항체는 카탈로그 번호 31002 하에 판매되는, Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, CA로부터 항-FGF21 항체일 수 있다. 일정한 구체예에서, FGF21의 아미노산 잔기 173-182에 결합하는 검출 항체는 카탈로그 번호 30661 하에 판매되는, Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, CA로부터 항-FGF21 항체일 수 있다. 일정한 구체예에서, 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정 방법은 (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계; (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계; (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계; 그리고 (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명은 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 면역검정 방법을 더욱 제공한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 이런 방법은 총 FGF21 단백질을 검출하기 위한 면역검정을 활성 FGF21 단백질을 검출하기 위한 면역검정과 조합하는 것을 수반할 수 있다. 일정한 구체예에서, 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 면역검정 방법은 (a)(i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하고; (ii) 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체와 접촉시키고; (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 첫 번째 검출 항체를 검출하고; 그리고 (iv) 결합된 첫 번째 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계; 그리고 (b)(i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하고; (ii) 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체와 접촉시키고; (iii) 표본-포

획 항체 조합 물질에 결합된 두 번째 검출 항체를 검출하고; 그리고 (iv) 결합된 두 번째 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함할 수 있다. 이들 방법은 단계 (a)에 의해 결정된 총 FGF21 단백질의 양을 단계 (b)에 의해 결정된 대로의 활성 FGF21 단백질의 양과 비교하여, 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체는 동일한 항체이다. 대안으로, 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체는 상이한 항체이지만, 둘 모두 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합한다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 중첩되지 않는, FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 에피토프에 결합한다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 부분적으로 중첩되는, FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 에피토프에 결합한다.

[0115] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 면역검정 방법은 약 2 pg/ml 내지 약 20 pg/ml의 검출 민감도, 예를 들면, 웰내 민감도를 갖는다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본원에서 개시된 면역검정은 약 2 pg/ml 내지 약 3 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 4 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 5 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 6 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 7 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 8 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 10 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 11 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 12 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 13 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 14 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 15 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 16 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 17 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 18 pg/ml, 약 2 pg/ml 내지 약 19 pg/ml, 약 3 pg/ml 내지 약 15 pg/ml, 약 3 pg/ml 내지 약 10 pg/ml 또는 약 3 pg/ml 내지 약 5 pg/ml의 민감도를 갖는다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 면역검정은 약 2 pg/ml 또는 그 이상, 1 pg/ml 또는 그 이상 또는 0.5 pg/ml 또는 그 이상의 민감도를 갖는다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 면역검정은 약 0.2 pg/ml 내지 약 2.0 pg/ml, 예를 들면, 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml, 약 0.2 pg/ml 내지 약 1.0 pg/ml 또는 약 0.2 pg/ml 내지 약 1.5 pg/ml의 검출 민감도, 예를 들면, 웰내 민감도를 갖는다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본원에서 개시된 면역검정, 예를 들면, Simoa HD-1 Analyzer™을 이용한 단일 분자 면역검정은 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 민감도, 예를 들면, 웰내 민감도를 갖는다.

[0116] 본 발명의 면역검정 방법에 의해 분석되는 표본은 임상적 표본, 배양 중인 세포, 세포 상층액, 세포 용해물, 혈청 표본, 혈액 혈장 표본, 다른 생물학적 유체 (예를 들면, 림프액) 표본 또는 조직 표본일 수 있다. 일정한 구체예에서, 표본의 공급원은 고형 조직 (예를 들면, 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기, 조직 표본, 혈청, 혈액 혈장, 생검 또는 흡인물로부터) 또는 개체로부터 세포일 수 있다. 일정한 구체예에서, 표본은 혈액 표본이다. 일정한 구체예에서, 표본은 혈장 표본이다. 일정한 구체예에서, 표본, 예를 들면, 혈액 또는 혈장 표본은 개체로부터 획득되고, 그리고 한 가지 또는 그 이상의 프로테아제, 에스테라아제, DDP-IV 및/또는 포스파타아제 저해제로 처리될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 표본은 프로테아제 및 포스파타아제 저해제의 콕테일, 예를 들면, MS-SAFE (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)로 처리될 수 있다. 일정한 구체예에서, 표본은 항응고제로 처리되거나 또는 항응고제, 예를 들면, K₂-EDTA를 내포하는 튜브에서 수집된다. 일정한 구체예에서, 표본은 P800 혈액 수집 시스템 (BD Biosciences, San Jose, CA)을 이용하여 수집될 수 있다.

[0117] III. 항체

[0118] 본 발명은 FGF21, 예를 들면, 인간 FGF21에 결합하는 항체를 더욱 제공한다. 본 발명의 항체는 표본 내 FGF21 단백질 수준을 검출하고 정량하는 데 유용하다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 본원에서 개시된, FGF21 단백질의 검출과 정량을 위한 면역검정 방법에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본 발명의 항체는 표본 내 총 FGF21 단백질 및/또는 활성 FGF21 단백질의 수준을 검출하는 데 이용될 수 있다.

[0119] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 인간화될 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 수용자 인간 프레임워크, 예를 들면, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크를 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 비롯한 단일클론 항체일 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본 발명의 항체는 키메라일 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다. 일정한 구체예에서, 항체는 IgG이다. 일정한 구체예에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 상기 항체는 전장 항체, 예를 들면, 무손상 IgG1 항체, 또는 본원에서 규정된 바와 같은 다른 항체 부류 또는 아이소타입이다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 항-FGF21 항체는 표지화될 수 있다, 예를 들면, 비오틴에 접합될 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 아래에 상술된 섹션 1-7에서 설명된 바와 같은 임의의 특질을 단독적으로 또는 조합으로 통합할 수 있다.

[0120] A. 예시적인 항-FGF21 항체

[0121] 본 발명은 FGF21 단백질에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172, 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합할 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 173-182, 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합할 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 1-4, 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 잔기 1-4 내에 존재하는 에피토프에 결합하지 않는다. 항-FGF21 항체의 무제한적 실례는 표 8-13 및 16-19, 그리고 도 41a-b에서 개시된다.

[0122] 본 발명은 일정한 구체예에서, (a) 서열 번호: 26-29 중에서 한 가지의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호: 30-33 중에서 한 가지의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호: 34-37 중에서 한 가지의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호: 38-41 중에서 한 가지의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호: 42-45 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L2; 그리고 (f) 서열 번호: 46-49 중에서 한 가지의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 CDRs를 포함하는 항-FGF21 항체를 제공한다.

[0123] 본 발명은 일정한 구체예에서, (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L2; 그리고 (f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 항-FGF21 항체를 제공한다.

[0124] 본 발명은 일정한 구체예에서, (a) 서열 번호: 27의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호: 31의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호: 35의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호: 39의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호: 43의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L2; 그리고 (f) 서열 번호: 47의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 항-FGF21 항체를 제공한다.

[0125] 본 발명은 일정한 구체예에서, (a) 서열 번호: 28의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호: 32의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호: 36의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호: 40의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호: 44의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L2; 그리고 (f) 서열 번호: 48의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 항-FGF21 항체를 제공한다.

[0126] 본 발명은 일정한 구체예에서, (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L2; 그리고 (f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 항-FGF21 항체를 제공한다.

[0127] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 54-57 및 72-75 중에서 한 가지의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항-FGF21 항체는 FGF21에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 구체예에서, 총 1개 내지 10 개의 아미노산이 치환되고, 삽입되고 및/또는 결실되었다. 일정한 구체예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDRs 외 부의 영역에서 (다시 말하면, FRs에서) 일어난다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 54-57 및 72-75 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열을 포함한다.

[0128] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 50-53 및 68-71 중에서 한 가지의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL) 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항-FGF21 항체는 FGF21에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 구체예에서, 총 1개 내지 10

개의 아미노산이 치환되고, 삽입되고 및/또는 결실되었다. 일정한 구체예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDRs 외부의 영역에서 (다시 말하면, FRs에서) 일어난다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 50-53 및 68-71 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함한다.

[0129] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 54의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 50의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.

[0130] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 55의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.

[0131] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 56의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 52의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.

[0132] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 57의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 53의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.

[0133] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 75의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 71의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.

- [0134] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 74의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 70의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.
- [0135] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 73의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 69의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.
- [0136] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 72의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 68의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, VH는 (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다. 일정한 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 그리고 (c) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3에서 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 CDRs를 포함한다.
- [0137] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 22-25 및 64-67 중에서 한 가지의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 전장 중쇄 (HC) 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 HC 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항-FGF21 항체는 FGF21에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 구체예에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 치환되고, 삽입되고 및/또는 결실되었다. 일정한 구체예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDRs 외부의 영역에서 (다시 말하면, FRs에서) 일어난다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 22-25 및 64-67 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 포함하는 HC 서열을 포함한다.
- [0138] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 18-21 및 60-63 중에서 한 가지의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 전장 경쇄 (LC) 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 LC 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항-FGF21 항체는 FGF21에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 구체예에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 치환되고, 삽입되고 및/또는 결실되었다. 일정한 구체예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDRs 외부의 영역에서 (다시 말하면, FRs에서) 일어난다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 18-21 및 60-63 중에서 한 가지의 아미노산 서열을 포함하는 LC 서열을 포함한다.
- [0139] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 22의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 18의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.
- [0140] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 23의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 19의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0141] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 24의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 20의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0142] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 25의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 21의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0143] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 67의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 63의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0144] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 62의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0145] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 65의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 61의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0146] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 64의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 HC 서열을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 서열 번호: 60의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 LC 서열을 포함한다.

[0147] 일정한 구체예에서, 항-FGF21 항체가 제공되는데, 여기서 상기 항체는 앞서 제공된 임의의 구체예의 경우에서와 같은 VH 및 앞서 제공된 임의의 구체예의 경우에서와 같은 VL을 포함한다. 일정한 구체예에서, 항-FGF21 항체가 제공되는데, 여기서 상기 항체는 앞서 제공된 임의의 구체예의 경우에서와 같은 전장 HC 및 앞서 제공된 임의의 구체예의 경우에서와 같은 전장 LC를 포함한다.

[0148] 1. 항체 친화성

[0149] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항-FGF21 항체는 $\leq 1 \text{ M}$, $\leq 100 \text{ mM}$, $\leq 10 \text{ mM}$, $\leq 1 \text{ mM}$, $\leq 100 \text{ } \mu\text{M}$, $\leq 10 \text{ } \mu\text{M}$, $\leq 1 \text{ } \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ 의 해리 상수 (K_d)를 가질 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 약 10^{-3} 또는 그 이하 또는 10^{-8} M 또는 그 이하, 예를 들면, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들면, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M 의 K_d 를 가질 수 있다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 항-FGF21 항체는 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M 의 K_d 를 가질 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본 발명의 포획 항체 또는 검출 항체는 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M 의 K_d 로 FGF21에 결합한다.

[0150] 일정한 구체예에서, K_d 는 방사성표지화된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정될 수 있다. 일정한 구체예에서, RIA는 관심되는 항체의 Fab 버전 및 이의 항원으로 수행될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 항원에 대한 Fabs의 용해 결합 친화성은 표지화되지 않은 항원의 적정 시리즈의 존재에서 Fab를 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원과 평형시키고, 이후 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 평판으로 포획함으로써 측정된다 (참조: 예를 들면, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). 검정을 위한 조건을 확립하기 위해, MICROTITER[®] 다중

웰 평판 (Thermo Scientific)이 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6)에서 5 µg/ml의 포획 항-Fab 항체 (Cappel Labs)로 하룻밤 동안 코팅되고, 그리고 차후에, 실온 (대략 23°C)에서 2 내지 5 시간 동안 PBS에서 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단된다. 비흡착성 평판 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원이 관심되는 Fab의 연속 희석액과 혼합된다 (예를 들면, Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)에서 항-VEGF 항체, Fab-12의 사정과 일치). 관심되는 Fab는 이후, 하룻밤 동안 항온처리된다; 하지만, 항온처리는 평형이 도달되도록 담보하기 위해 더욱 긴 기간 (예를 들면, 약 65 시간) 동안 계속될 수도 있다. 그 후에, 혼합물이 실온에서 항온처리를 위해 포획 평판으로 이전된다 (예를 들면, 1 시간 동안). 용액은 이후, 제거되고, 그리고 평판이 PBS에서 0.1% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20[®])으로 8회 세척된다. 평판이 건조될 때, 150 µl/웰의 신틸란트 (MICROSCINT-20[™]; Packard)가 첨가되고, 그리고 이들 평판은 TOPCOUNT[™] 감마 계수기 (Packard)에서 10 분 동안 계수된다. 최대 결합의 20% 이하이거나 또는 이와 동등한 결합을 제공하는 각 Fab의 농도가 경쟁적 결합 검정에서 이용을 위해 선택된다.

[0151] 일정한 구체예에서, K_d는 BIACORE[®] 표면 플라스몬 공명 검정을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, BIACORE[®]-2000, BIACORE[®]-3000, BIACORE X100 또는 BIACORE T200 처리 장치 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용한 검정이 ~10 반응 단위 (RU)에서 고정된 항원 CM5 칩으로 25°C에서 수행된다. 일정한 구체예에서, 카르복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, Biacore, Inc.)은 공급업체의 사용설명서에 따라 *N*-에틸-*N'*-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이미드 염산염 (EDC) 및 *N*-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화된다. 항원은 거의 10 반응 단위 (RU)의 연계된 단백질을 달성하기 위해, 5 µl/분의 유속에서 주입 전에 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8로 5 µg/ml (~0.2 µM)까지 희석된다. 항원의 주입 이후에, 반응하지 않은 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민이 주입된다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2-배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)이 거의 25 µl/분의 유속에서 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20[™]) 계면활성제를 포함하는 PBS (PBST)에 주입된다. 연관률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 연관 및 해리 센서그램을 동시에 적합시킴으로써 단순한 1 대 1 랭뮤어 결합 모형 (BIACORE[®] 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 계산된다. 평형 해리 상수 (K_d)는 비율 k_{off}/k_{on}으로서 계산될 수 있다. 참조: 예를 들면, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). 온 레이트가 상기 표면 플라스몬 공명 검정에 의해 10⁶ M⁻¹ s⁻¹를 초과하면, 온 레이트는 분광계, 예컨대 정지-유동 구비된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳이 달린 8000-시리즈 SLM-AMINCO[™] 분광광도계 (ThermoSpectronic)에서 측정될 때 증가하는 농도의 항원의 존재에서 PBS, pH 7.2에서, 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 퀀칭 기술을 이용함으로써 결정될 수 있다.

[0152] 2. 항체 단편

[0153] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편, 그리고 아래에 설명된 다른 단편을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 항체 단편의 리뷰를 위해, Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)를 참조한다. ScFv 단편의 리뷰를 위해, 예를 들면, Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)를 참조한다; 또한, WO 93/16185; 및 U.S. 특허 번호 5,571,894와 5,587,458을 참조한다. 구체 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의를 위해, U.S. 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0154] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 디아바디일 수 있다. 디아바디는 이가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 포함하는 항체 단편이다. 참조: 예를 들면, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). 본 발명의 항체의 범위 안에 추가 항체 단편인 트리아바디 및 테트라바디 역시 Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)에서 설명된다.

[0155] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인 중에서 전부 또는 일부, 또는 항체의 경쇄 가변 도메인 중에서 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 일정한 구체예에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 참조: 예를

들면, U.S. 특허 번호 6,248,516 B1).

[0156] 항체 단편은 본원에서 설명된 바와 같이, 무손상 항체의 단백질분해 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들면 대장균 (*E. coli*) 또는 파지)에 의한 생산을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어 질 수 있다.

[0157] 3. 키메라 및 인간화 항체

[0158] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 키메라 항체이다. 일정한 키메라 항체는 당해 분야, 예를 들면, U.S. 특허 번호 4,816,567; 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))에서 설명된다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 키메라 항체는 비인간 가변 영역 (예를 들면, 생쥐, 쥐, 햄스터, 토끼, 또는 비인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 실례에서, 키메라 항체는 "부류 전환된" 항체일 수 있는데, 여기서 부류 또는 하위부류가 부모 항체의 것으로부터 변화되었다. 키메라 항체는 이들의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0159] 일정한 구체예에서, 본 발명의 키메라 항체는 인간화 항체일 수 있다. 전형적으로, 비인간 항체는 부모 비인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서, 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 CDRs, 예를 들면, CDRs (또는 이들의 부분)가 비인간 항체로부터 유래되고, 그리고 FRs (또는 이들의 부분)가 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 또는 그 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의적으로, 인간 불변 영역 중에서 적어도 일부를 또한 포함할 것이다. 일정한 구체예에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 예를 들면, 항체 특이성 또는 친화성을 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비인간 항체 (예를 들면, CDR 잔기가 유래되는 항체)로부터 상응하는 잔기로 치환된다.

[0160] 인간화 항체 및 이들을 만드는 방법은 예를 들면, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)에서 리뷰되고, 그리고 예를 들면, Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US 특허 번호 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 및 7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (특이성 결정 영역 (SDR) 합체를 설명); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ("표면치환"을 설명); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) ("FR 뒤섞음"을 설명); 그리고 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FR 뒤섞음에 대한 "보도된 선별" 접근법을 설명)에서 더욱 설명된다.

[0161] 인간화에 이용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 다음을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: "최고 적합" 방법을 이용하여 선별된 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 인간 성숙 (체성으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 그리고 선별검사 FR 라이브러리로부터 유래된 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

[0162] 4. 인간 항체

[0163] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 인간 항체일 수 있다. 인간 항체는 당해 분야에서 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)에서 전반적으로 설명된다.

[0164] 인간 항체는 항원 공격에 대한 응답으로 무손상 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 포함하는 무손상 항체를 생산 하도록 변형된 유전자도입 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이런 동물은 전형적으로, 내인성 면역글로불린 좌위를 대체하거나, 또는 염색체외로 존재하거나 또는 동물의 염색체 내로 무작위로 통합되는 인간 면역글로불린 좌위 중에서 전부 또는 일부를 내포한다. 이런 유전자도입 생쥐에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 일반적으로 비활성화된다. 유전자도입 동물로부터 인간 항체를 획득하기 위한 방법의 리뷰를 위해, Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)를 참조한다. 또한, 예를 들면, XENOMOUSE™ 기술을 설명하는 U.S. 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584; HUMAB® 기술을 설명하는 U.S. 특허 번호 5,770,429; K-M MOUSE® 기술을 설명하는 U.S. 특허 번호 7,041,870, 그리고 VELOCIMOUSE® 기술을 설명하는 U.S. 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900 을 참조한다. 이런 동물에 의해 산출된 무손상 항체로부터 인간 가변 영역은 예를 들면, 상이한 인간 불변 영역

과 조합함으로써 더욱 변형될 수 있다.

[0165] 인간 항체는 또한, 하이브리도마-기초된 방법에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단일클론 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 생쥐-인간 헤테로골수종 세포주가 설명되었다. (참조: 예를 들면, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). 인간 B-세포 하이브리도마 기법을 통해 산출된 인간 항체 역시 Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)에서 설명된다. 추가 방법은 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터 단일클론 인간 IgM 항체의 생산을 설명) 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기법 (트리오마 기술) 역시 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)에서 설명된다.

[0166] 인간 항체는 또한, 인간-유래된 파지 전사 라이브러리에서 선택되는 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 산출될 수 있다. 이런 가변 도메인 서열은 이후, 원하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술은 아래에 설명된다.

[0167] 5. 라이브러리-유래된 항체

[0168] 본 발명의 항체는 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 선별검사함으로써 단리될 수 있다. 예를 들면, 파지 전사 라이브러리를 산출하고, 그리고 원하는 결합 특징을 소유하는 항체에 대해 이런 라이브러리를 선별검사하기 위한 다양한 방법이 당해 분야에서 공지된다. 이런 방법은 예를 들면, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)에서 리뷰되고, 그리고 예를 들면, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)에서 더욱 설명된다.

[0169] 일정한 파지 전사 방법에서, VH와 VL 유전자의 레퍼토리는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 별도로 클로닝되고 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합되는데, 이들 라이브러리는 이후, Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)에서 설명된 바와 같이 항원 결합 파지에 대해 선별검사될 수 있다. 파지는 전형적으로, 단일 사슬 Fv (scFv) 단편으로서 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 전시한다. 면역화된 공급원으로부터 라이브러리는 하이브리도마를 구축하는 요건 없이 면역원에 대한 높은 친화성 항체를 제공한다. 대안으로, 미경험 레퍼토리는 Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)에 의해 설명된 바와 같이, 면역화 없이 넓은 범위의 비자가 및 또한 자가 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공하도록 클로닝될 수 있다 (예를 들면, 인간으로부터). 일정한 구체예에서, 미경험 라이브러리는 또한, Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)에 의해 설명된 바와 같이, 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 분절을 클로닝하고, 그리고 고도로 가변적 CDR3 영역을 인코딩하고 시험관내에서 재배열을 달성하기 위한 무작위 서열을 내포하는 PCR 프라이머를 이용함으로써 합성적으로 만들어질 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 설명하는 특허 공보는 예를 들면, US 특허 번호 5,750,373, 그리고 US 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0170] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편인 것으로 고려된다.

[0171] 6. 다중특이적 항체

[0172] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체일 수 있다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 단일클론 항체이다. 일정한 구체예에서, 결합 특이성 중에서 하나는 FGF21 상에 존재하는 에피토프에 대한 것이고, 그리고 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0173] 다중특이적 항체를 만들기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 제조합 공동 발현 (참조: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 및 Traunecker et al., *EMBO J.*

10: 3655 (1991)), 그리고 "노브-인투-홀 (knob-into-hole)" 가공 (참조: 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,731,168)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 다중특이적 항체는 또한, 항체 Fc-이형이합체성 분자를 만들기 위해 정전 스티어링 효과를 가공하고 (WO 2009/089004A1); 2개 또는 그 이상의 항체 또는 단편을 교차연결하고 (참조: 예를 들면, US 특허 번호 4,676,980 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); 이중특이적 항체를 생산하기 위해 류신 지퍼를 이용하고 (참조: 예를 들면, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 이중특이적 항체 단편을 만들기 위해 "디아바디" 기술을 이용하고 (참조: 예를 들면, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 그리고 단일 사슬 Fv (sFv) 이합체를 이용하고 (참조: 예를 들면, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 그리고 예를 들면, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에서 설명된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조함으로써 만들어질 수 있다.

[0174] "문어 항체"를 비롯하여, 3개 또는 그 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 가공된 항체 역시 본원에서 포함된다 (참조: 예를 들면, US 2006/0025576A1).

[0175] 7. 항체 변이체

[0176] 본원에서 개시된 요부는 개시된 항체의 아미노산 서열 변이체를 더욱 제공한다. 예를 들면, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 성질을 향상시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 상기 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 내로 적절한 변형을 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이런 변형은 항체의 아미노산 서열로부터 결실 및/또는 이들 서열 내로 삽입 및/또는 이들 서열 내에 잔기의 치환을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 최종 항체, 다시 말하면, 변형된 항체가 원하는 특징, 예를 들면, 항원 결합을 소유한다면, 최종 작제물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 만들어질 수 있다.

[0177] a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0178] 항체 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 가질 수 있다. 이런 변형을 위한 관심되는 부위는 CDRs 및 FRs를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 보존성 치환의 무제한적 실례는 "바람직한 치환"의 표제 하에 표 1에서 도시된다. 더욱 실제적인 변화의 무제한적 실례는 "예시적인 치환"의 표제 하에 표 1에서 제공되고, 그리고 아미노산 측쇄 부류에 관하여 아래에 더욱 설명된다. 아미노산 치환은 관심되는 항체 내로 도입될 수 있고, 그리고 산물은 원하는 활성, 예를 들면, 유지된/향상된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 향상된 보체 의존성 세포독성 (CDC) 또는 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC)에 대해 선별검사될 수 있다.

[0179] 표 1

표 1

[0180]

본래 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

- [0181] 아미노산은 공통 측쇄 성질에 따라 군화될 수 있다:
- [0182] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0183] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0184] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0185] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0186] (5) 사슬 배향정위에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0187] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0188] 일정한 구체예에서, 비보존성 치환은 이들 부류 중에서 한 가지의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [0189] 일정한 구체예에서, 치환 변이체의 한 가지 유형은 부모 항체의 하나 또는 그 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다, 예를 들면, 인간화 또는 인간 항체이다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선별된 결과의 변이체(들)는 부모 항체에 비하여 일정한 생물학적 성질에서 변형, 예를 들면, 향상, 예컨대, 하지만 제한 없이, 증가된 친화성, 감소된 면역원성을 가질 것이고 및/또는 부모 항체의 실제적으로 유지된 일정한 생물학적 성질을 가질 것이다. 치환 변이체의 무제한적 실례는 친화성 성숙된 항체인데, 이것은 예를 들면, 파지 전시-기초된 친화성 성숙 기술, 예컨대 본원에서 설명된 것들을 이용하여 편의하게 산출될 수 있다. 간단히 말하면, 하나 또는 그 이상의 CDR 잔기가 돌연변이되고, 그리고 변이체 항체는 파지에서 전시되고 특정 생물학적 활성 (예를 들면, 결합 친화성)에 대해 선별검사된다.
- [0190] 일정한 구체예에서, 예를 들면, 항체 친화성을 향상시키기 위해 CDRs에서 변경 (예를 들면, 치환)이 만들어질 수 있다. 이런 변경은 CDR "핫스팟", 다시 말하면, 체성 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩된 잔기 (참조: 예를 들면, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) 및/또는 항원에 접촉하는 잔기에서 만들어질 수 있고, 결과의 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화성에 대해 검사된다. 이차 라이브러리를 구축하고 이들로부터 재선별함에 의한 친화성 성숙은 예를 들면, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))에서 설명되었다. 친화성 성숙의 일정한 구체예에서, 다양성이 임의의 다양한 방법 (예를 들면, 오류 가능성 PCR, 사슬 뒤섞임, 또는 올리고뉴클레오티드-유도 돌연변이)에 의해, 성숙을 위해 선택된 가변적 유전자 내로 도입될 수 있다. 이차 라이브러리가 이후 창출된다. 상기 라이브러리는 이후, 원하는 친화성을 갖는 임의의 항체 변이체를 확인하기 위해 선별검사된다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 CDR-지향된 접근법을 수반하는데, 여기서 여러 CDR 잔기 (예를 들면, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관련된 CDR 잔기는 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모형화를 이용하여 특이적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.
- [0191] 일정한 구체예에서, 치환, 삽입 및/또는 결실은 이런 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실제적으로 감소시키지 않으면, 하나 또는 그 이상의 CDRs 내에서 일어날 수 있다. 예를 들면, 결합 친화성을 실제적으로 감소시키지 않는 보존성 변경 (예를 들면, 본원에서 제시된 바와 같은 보존성 치환)이 CDRs에서 만들어질 수 있다. 이런 변경은 예를 들면, CDRs에서 항원 접촉 잔기의 외부에 있을 수 있다. 앞서 제공된 변이체 VH와 VL 서열의 일정한 구체예에서, 각 CDR은 변경되지 않거나, 또는 단지 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 내포한다.
- [0192] 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인을 위한 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에 의해 설명된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이러한 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들면, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu)이 확인되고, 그리고 항체의 항원과의 상호작용이 영향을 받는 지를 결정하기 위해 중성 또는 음성으로 하전된 아미노산 (예를 들면, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체된다. 추가 치환은 초기 치환에 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치에서 도입될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 항체 및 항원 사이에 접촉 포인트를 확인하기 위한 항원 항체 복합체의 결정 구조. 이런 접촉 잔기 및 인접한 잔기는 치환의 후보로서 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 원하는 성질을 내포하는 지를 결정하기 위해 선별검사될 수 있다.
- [0193] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기로부터 100개 또는 그 이상의 잔기를 내포하는 폴리펩티드까지의 길이 범위에서 변하는 아미노 및/또는 카르복실 말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 복수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한

다. 말단 삽입의 실례는 N 말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 (예를 들면, 항체-지향된 효소 전구약물 요법 (ADEPT)의 경우) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C 말단에 융합을 포함한다.

[0194] **b) 글리코실화 변이체**

[0195] 본 발명의 항체는 일정한 구체예에서, 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 또는 감소시키기 위해 변경될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 항체에 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 또는 그 이상의 글리코실화 부위가 창출되거나 또는 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편의하게 달성될 수 있다.

[0196] 본 발명의 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에, 거기에 부착된 탄수화물 (만약 존재하면)은 변경될 수 있다. 포유류 세포에 의해 생산된 선천적 항체는 전형적으로, Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-연쇄에 의해 일반적으로 부착되는 분지된, 바이안테나리 올리고당류를 포함한다. 참조: 예를 들면, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). 올리고당류는 다양한 탄수화물, 예를 들면, 만노오스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토오스 및 시알산뿐만 아니라 바이안테나리 올리고당류 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코오스를 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체에서 올리고당류의 변형은 일정한 향상된 성질을 갖는 항체 변이체를 창출하기 위해 만들어질 수 있다.

[0197] 일정한 구체예에서, Fc 영역에 부착된 (직접적으로 또는 간접적으로) 푸코오스를 결여하는 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들면, 이런 항체에서 푸코오스의 양은 약 1% 내지 약 80%, 약 1% 내지 약 65%, 약 5% 내지 약 65% 또는 약 20% 내지 약 40%, 그리고 그 사이에 값일 수 있다.

[0198] 일정한 구체예에서, 푸코오스의 양은 예를 들면, WO 2008/077546에서 설명된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분광분석법에 의해 계속될 때, Asn 297에 부착된 모든 당구조의 총합 (예를 들면, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노오스 구조)에 비하여, Asn297에서 당 사슬 내에 푸코오스의 평균량을 계산함으로써 결정될 수 있다. Asn297은 Fc 영역 내에 대략 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에서 위치된 아스파라긴 잔기를 지칭한다; 하지만, Asn297은 또한, 항체에서 경미한 서열 변이로 인해, 위치 297의 대략 $\pm$ 3개 아미노산 상류 또는 하류에, 다시 말하면, 위치 294 및 300 사이에 위치될 수 있다. 이런 푸코실화 변이체는 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 참조: 예를 들면, US 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). "탈푸코실화된" 또는 "푸코오스-결합성" 항체 변이체에 관련된 간행물의 실례는 다음을 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004).

[0199] 탈푸코실화된 항체는 단백질 푸코실화에서 결합되는 임의의 세포주에서 생산될 수 있다. 세포주의 무제한적 실례는 단백질 푸코실화에서 결합성인 Lec13 CHO 세포 (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams et al., 특히 실시예 11), 그리고 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실전달효소 유전자, *FUT8*, 녹아웃 CHO 세포 (참조: 예를 들면, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 및 WO2003/085107)를 포함한다.

[0200] 항체 변이체는 양분된 올리고당류가 더욱 제공되는데, 예를 들면, 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테나리 올리고당류는 GlcNAc에 의해 양분된다. 이런 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이런 항체 변이체의 무제한적 실례는 예를 들면, WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); US 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에서 설명된다. 올리고당류 내에 적어도 하나의 갈락토오스 잔기가 Fc 영역에 부착되는 항체 변이체 역시 제공된다. 이런 항체 변이체는 향상된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이런 항체 변이체는 예를 들면, WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에서 설명된다.

[0201] **c) Fc 영역 변이체**

[0202] 일정한 구체예에서, 한 가지 또는 그 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공된 항체의 Fc 영역 내로 도입되고, 따라서 Fc 영역 변이체가 산출될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들면, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

- [0203] 일정한 구체예에서, 본 발명은 전부는 아니지만 일부 작동체 기능을 소유하는 항체 변이체를 제공한다. 이런 한정된 작동체 기능으로 인해, 이들 항체 변이체는 생체내에서 항체의 반감기가 중요하고 일정한 작동체 기능 (예컨대, 보체 및 ADCC)가 불필요하거나 또는 유해한 적용을 위한 바람직한 후보가 될 수 있다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확증하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정이 수행될 수 있다. 예를 들면, 항체가 Fc γ R 결합을 결여 (따라서, ADCC 활성을 아마도 결여)하지만, FcRn 결합 능력을 유지하도록 담보하기 위해, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정이 수행될 수 있다. ADCC를 매개하기 위한 일차 세포, NK 세포는 단지 Fc γ RIII만을 발현하고, 반면 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)의 464 페이지 상에 표 3에서 요약된다. 관심되는 분자의 ADCC 활성을 사정하기 위한 시험관내 검정의 무제한적 실례는 U.S. 특허 번호 5,500,362 (예를 들면, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)을 참조한다) 및 Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)을 참조한다)에서 설명된다. 대안으로, 비방사성 검정 방법이 이용될 수 있다 (참조: 예를 들면, 유세포 분석법의 경우에 ACTI™ 비방사성 세포독성 검정 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 및 CYTOTOX 96® 비방사성 세포독성 검정 (Promega, Madison, WI)). 이런 검정을 위한 유용한 작동체 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안으로 또는 부가적으로, 관심되는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들면, 동물 모형, 예컨대 Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)에서 개시된 것에서 사정될 수 있다. 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성을 결여한다는 것을 확증하기 위해, C1q 결합 검정 또한 실행될 수 있다. 참조: 예를 들면, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q와 C3c 결합 ELISA. 보체 활성화를 사정하기 위해, CDC 검정이 수행될 수 있다 (참조: 예를 들면, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). FcRn 결합 및 생체내 소실/반감기 결정이 또한, 당해 분야에서 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다 (참조: 예를 들면, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)). 일정한 구체예에서, 예를 들면, US 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642 및 Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)에서 설명된 바와 같이, 변경된 (다시 말하면, 향상된 또는 축소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 유발하는 Fc 영역에서 변경이 만들어질 수 있다.
- [0204] 감소된 작동체 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중에서 하나 또는 그 이상의 치환을 갖는 것들을 포함한다 (U.S. 특허 번호 6,737,056). 이런 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 이른바 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯하여, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 또는 그 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다 (US 특허 번호 7,332,581).
- [0205] FcRs에 향상된 또는 축소된 결합을 갖는 일정한 항체 변이체가 설명된다. 참조: 예를 들면, U.S. 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 그리고 Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).
- [0206] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체 변이체는 ADCC를 향상시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 예를 들면, Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.
- [0207] 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 항체, 예를 들면, 이중특이적 항체의 Fc 영역에서 만들어진 변경은 증가된 반감기, 그리고 모계 IgGs의 태아로의 전달을 책임지는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 향상된 결합을 갖는 변이체 항체 (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) 및 Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994))를 생산할 수 있고, US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에서 설명된다. 이들 항체는 FcRn에 Fc 영역의 결합을 향상시키는, 그 안에 하나 또는 그 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이런 Fc 변이체는 다음의 Fc 영역 잔기 중 하나 또는 그 이상에서 치환: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예를 들면, Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것들을 포함한다 (US 특허 번호 7,371,826).
- [0208] Fc 영역 변이체의 다른 실례와 관련하여, Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); U.S. 특허 번호 5,648,260; U.S. 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 또한 참조한다.
- [0209] **d) 시스테인 가공된 항체 변이체**
- [0210] 일정한 구체예에서, 시스테인 가공된 항체, 예컨대 "thioMAbs"를 창출하는 것이 바람직할 수 있는데, 여기서 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된다. 특정한 구체예에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 발생한다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올기는 따라서, 항체의 접근가능

한 부위에서 위치되고, 그리고 상기 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합하여 본원에서 더욱 설명된 바와 같은 면역접합체를 창출하는 데 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 다음의 잔기 중에서 하나 또는 그 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (Kabat 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 가공된 항체는 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,521,541에서 설명된 바와 같이 산출될 수 있다.

[0211] e) 항체 유도체

[0212] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 당해 분야에서 공지되고 쉽게 가용한 추가 비단백질성 모이어티를 내포하도록 더욱 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 수용성 중합체의 무제한적 실례는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (동중중합체 또는 무작위 공중합체), 그리고 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동중중합체, 프롤릴프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예를 들면, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 그리고 이들의 혼합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서 안정성으로 인해, 제조 시에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 그리고 분지되거나 또는 분지되지 않을 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 숫자는 변할 수 있고, 그리고 하나 이상의 중합체가 부착되면, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 이용되는 중합체의 숫자 및/또는 유형은 향상되는 항체의 특정 성질 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 이용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 고려 사항에 기초하여 결정될 수 있다.

[0213] 일정한 구체예에서, 방사선에 노출에 의해 선별적으로 가열될 수 있는 항체 및 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 구체예에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). 일정한 구체예에서, 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 그리고 일상적인 세포를 훼손하지 않지만 비단백질성 모이어티를 항체-비단백질성 모이어티 근위의 세포가 사멸되는 온도까지 가열하는 파장을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0214] B. 항체 생산 방법

[0215] 본원에서 개시된 항체는 당해 분야에서 임의의 가용한 또는 공지된 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 항체는 예를 들면, U.S. 특허 번호 4,816,567에서 설명된 바와 같은 재조합 방법과 조성물을 이용하여 생산될 수 있다. 항체를 산출하기 위한 상세한 절차는 아래의 실시예에서 설명된다.

[0216] 본원에서 개시된 요부는 본원에서 개시된 항체를 인코딩하는 단리된 핵산을 더욱 제공한다. 예를 들면, 단리된 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열, 예를 들면, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 인코딩할 수 있다. 일정한 구체예에서, 단리된 핵산은 서열 번호: 54에서 진술된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 서열 번호: 50에서 진술된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 단리된 핵산은 서열 번호: 57에서 진술된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 서열 번호: 53에서 진술된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0217] 일정한 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 벡터, 예를 들면, 발현 벡터 내에 존재할 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 자신에게 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 가지 유형은 "플라스미드"인데, 이것은 추가 DNA 분절이 결합될 수 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터인데, 여기서 추가 DNA 분절이 바이러스 유전체 내로 결합될 수 있다. 일정한 벡터 (예를 들면, 세균 복제 기점 및 에피솜 포유류 벡터를 갖는 세균 벡터)는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자동 복제할 수 있다. 다른 벡터 (예를 들면, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 유전체 내로 통합되고, 그리고 따라서, 숙주 유전체와 함께 복제된다. 게다가, 일정한 벡터, 발현 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 주동할 수 있다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종, 플라스미드 (벡터)의 형태이다. 하지만, 개시된 요부는 동등한 기능을 제공하는 이런 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 (예를 들면, 복제 결함성 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관된 바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다.

- [0218] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체를 인코딩하는 핵산 및/또는 상기 핵산을 포함하는 하나 또는 그 이상의 벡터가 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 일정한 구체예에서, 세포 내로 핵산의 도입은 형질감염, 전기천공, 미량 주사, 핵산 서열을 내포하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터로 감염, 세포 융합, 염색체-매개된 유전자 전달, 마이크로세포-매개된 유전자 전달, 스페로플라스트 융합 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는, 당해 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 실행될 수 있다. 일정한 구체예에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 첫 번째 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 두 번째 벡터를 포함할 수 있다, 예를 들면, 이것으로 형질전환되었다. 일정한 구체예에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들면, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프구양 세포 (예를 들면, Y0, NS0, Sp20 세포)이다.
- [0219] 일정한 구체예에서, 개시된 항-FGF21 항체를 만드는 방법은 상기 항체의 발현에 적합한 조건 하에, 상기 항체를 인코딩하는 핵산이 도입된 숙주 세포를 배양하고, 그리고 숙주 세포 및/또는 숙주 세포 배양 배지로부터 항체를 임의적으로 회수하는 것을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 항체는 크로마토그래피 기술을 통해 숙주 세포로부터 회수된다.
- [0220] 본 발명의 항체의 재조합 생산의 경우에, 예를 들면, 전술된 바와 같은 항체를 인코딩하는 핵산이 단리되고, 그리고 숙주 세포에서 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 또는 그 이상의 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이런 핵산은 전통적인 절차를 이용하여 (예를 들면, 항체의 중쇄와 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함으로써) 쉽게 단리되고 염기서열결정될 수 있다.
- [0221] 항체-인코딩벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 본원에서 설명된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들면, 항체는 특히 글리코실화 및 Fc 작동체 기능이 필요하지 않을 때 세균에서 생산될 수 있다. 세균에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해, 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. (대장균 (*E. coli*)에서 항체 단편의 발현을 설명하는, Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254를 또한 참조한다). 발현 후, 항체는 가용성 분획물에서 세균 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고 더욱 정제될 수 있다.
- [0222] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어, 부분적으로 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 생산을 유발하는 균류 및 효모 균주를 비롯한, 실모양 균류 또는 효모가 항체-인코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 참조: Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) 및 Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006). 글리코실화된 항체의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 또한, 다세포 생물체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래될 수 있다. 무척추동물 세포의 실례는 식물과 곤충 세포를 포함한다. 특히, 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 이용될 수 있는 다양한 바쿨로바이러스 계통이 확인되었다.
- [0223] 글리코실화된 항체의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 또한, 다세포 생물체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 실례는 식물과 곤충 세포를 포함한다. 특히, 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 이용될 수 있는 다양한 바쿨로바이러스 계통이 확인되었다.
- [0224] 일정한 구체예에서, 식물 세포 배양액 또한, 숙주로서 활용될 수 있다. 참조: 예를 들면, US 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (유전자도입 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 설명).
- [0225] 일정한 구체예에서, 척추동물 세포 또한, 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 현탁 상태에서 성장하도록 적응되는 포유류 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 무제한적 실례는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들면, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)에서 설명된 바와 같은 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK); 생쥐 세르틀리 세포 (예를 들면, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)에서 설명된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK; 버팔로 쥐 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 생쥐 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들면, Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)에서 설명된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유류 숙주 세포주는 DHFR⁻ CHO 세포를 비롯한, 중국 햄스터

난소 (CHO) 세포 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 일정한 포유류 숙주 세포주에 관한 리뷰를 위해, 예를 들면, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)을 참조한다.

[0226] 일정한 구체예에서, 이중특이적 및/또는 다중특이적 항체를 만들기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동발현 (참조: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), PCT 특허 출원 번호 WO 93/08829 및 Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), 그리고 "노브-인트루-홀 (knob-into-hole)" 가공 (참조: 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,731,168)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 이중특이적 항체는 또한, 항체 Fc-이형이합체성 분자를 만들기 위해 정전 스티어링 효과를 가공하고 (WO 2009/089004A1); 2개 또는 그 이상의 항체 또는 단편을 교차연결하고 (참조: 예를 들면, US 특허 번호 4,676,980 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); 이중특이적 항체를 생산하기 위해 류신 지퍼를 이용하고 (참조: 예를 들면, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 이중특이적 항체 단편을 만들기 위해 "디아바디" 기술을 이용하고 (참조: 예를 들면, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 그리고 단일 사슬 Fv (sfv) 이합체를 이용하고 (참조: 예를 들면, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 그리고 예를 들면, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에서 설명된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조함으로써 만들어질 수 있다.

[0227] 본 발명의 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한, 화학적 기술 (참조: 예를 들면, Kranz (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807), "폴리도마" 기술 (참조: 예를 들면, U.S. 특허 4,474,893) 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들어질 수 있다. 본원에서 개시된 요부의 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한, 당해 분야에서 공지되고 본원에서 설명된 바와 같은 방법을 이용하여, 성분 결합 특이성, 예를 들면, 첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프 결합 특이성을 접합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 이중특이적 및 다중특이적 분자의 각 결합 특이성은 별개로 산출되고, 그리고 이후 서로 접합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질 또는 펩티드일 때, 다양한 연계 또는 교차연결 작용제가 공유 접합에 이용될 수 있다. 교차연결 작용제의 무제한적 실례는 단백질 A, 카르보다이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세트산염 (SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피온산염 (SPDP), 그리고 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실산염 (술포-SMCC)을 포함한다 (참조: 예를 들면, Karpovsky (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). 다른 방법은 Paulus (*Behring Ins. Mitt.* (1985) No. 78, 118-132; Brennan (1985) *Science* 229:81-83), Glennie (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375)에 의해 설명된 것들을 포함한다. 결합 특이성이 항체 (예를 들면, 2개의 인간화 항체)일 때, 이들은 2개 중쇄의 C 말단 힌지 영역의 술포드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 일정한 구체예에서, 힌지 영역은 접합에 앞서, 홀수, 예를 들면, 하나의 술포드릴 잔기를 내포하도록 변형될 수 있다.

[0228] 일정한 구체예에서, 이중특이적 항체의 양쪽 결합 특이성은 동일한 벡터에서 인코딩되고, 그리고 동일한 숙주 세포에서 발현되고 조립될 수 있다. 이러한 방법은 이중특이적 및 다중특이적 분자가 MAb x MAb, MAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 단일 사슬 분자, 예컨대 단일 사슬 이중특이적 항체, 하나의 단일 사슬 항체 및 결합 결정인자를 포함하는 단일 사슬 이중특이적 분자, 또는 2개의 결합 결정인자를 포함하는 단일 사슬 이중특이적 분자일 수 있다. 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한, 단일 사슬 분자일 수 있거나 또는 적어도 2개의 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 및 다중특이적 분자를 제조하기 위한 방법은 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,260,203; U.S. 특허 번호 5,455,030; U.S. 특허 번호 4,881,175; U.S. 특허 번호 5,132,405; U.S. 특허 번호 5,091,513; U.S. 특허 번호 5,476,786; U.S. 특허 번호 5,013,653; U.S. 특허 번호 5,258,498; 및 U.S. 특허 번호 5,482,858에서 설명된다. "문어 항체"를 비롯하여, 3개 또는 그 이상의 기능적 항원 결합 부위 (예를 들면, 에피토프 결합 부위)를 갖는 가공된 항체 역시 본원에서 포함된다 (참조: 예를 들면, US 2006/0025576A1).

[0229] 일정한 구체예에서, 동물 시스템이 본 발명의 항체를 생산하는 데 이용될 수 있다. 하이브리도마를 제조하기 위한 한 가지 동물 시스템은 뮌헨 시스템이다. 생쥐에서 하이브리도마 생산은 매우 널리 확립된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 단리를 위한 면역화 프로토콜과 기술은 당해 분야에서 공지된다. 융합 파트너 (예를 들면, 뮌헨 골수종 세포) 및 융합 절차 또한 알려져 있다 (참조: 예를 들면, Harlow and Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

[0230] **C. 결합 경쟁 검정**

[0231] 본원에서 제공된 본 발명의 항-FGF21 항체는 당해 분야에서 공지되고 본원에서 제공된 다양한 검정에 의해, 그들의 물리적/화학적 성질 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인되거나, 선별검사되거나, 또는 특징화될 수 있다.

[0232] **1. 결합 검정 및 다른 검정**

[0233] 본 발명의 항체는 공지된 방법, 예를 들면, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 방사면역검정 (RIA) 또는 웨스턴 블롯 검정에 의해 항원 결합 활성에 대해 검사될 수 있다. 이들 검정 각각은 일반적으로, 관심되는 복합체에 대해 특이적인 표지화된 시약 (예를 들면, 항체)을 이용함으로써, 특히 관심되는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들면, FGF21-항체 복합체는 예를 들면, 이들 항체-FGF21 복합체를 인식하고 이들에 특이적으로 결합하는 효소-연결된 항체 또는 항체 단편을 이용하여 검출될 수 있다. 대안으로, 이들 복합체는 임의의 다양한 다른 면역검정을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들면, 항체는 방사성으로 표지화되고 방사면역검정 (RIA)에서 이용될 수 있다 (참조: 예를 들면, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 이것은 본원에서 참조로서 편입된다). 방사성동위원소는 가이거 계수기 또는 섬광 계수기의 이용과 같은 수단에 의해 또는 자가방사선술에 의해 검출될 수 있다.

[0234] 일정한 구체예에서, 경쟁 검정이 FGF21에 결합에 대해 본 발명의 항-FGF21 항체, 예를 들면, mAb4 또는 mAb15와 경쟁하는 항체를 확인하는 데 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 이런 경쟁 항체는 mAb4 또는 mAb15에 의해 결합되는 동일한 에피토프 (예를 들면, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 지도화하기 위한 상술된 예시적인 방법은 Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)에서 제공된다.

[0235] 경쟁 검정의 무제한적 실례에서, 고정된 FGF21가 FGF21에 결합하는 첫 번째 표지화된 항체 (예를 들면, mAb4 또는 mAb15) 및 FGF21에 결합에 대해 첫 번째 항체와 경쟁하는 능력에 대해 검사되는 두 번째 표지화되지 않은 항체를 포함하는 용액에서 항온처리될 수 있다. 두 번째 항체가 하이브리도마 상층액 내에 존재할 수 있다. 대조로서, 고정된 FGF21가 첫 번째 표지화된 항체를 포함하지만, 두 번째 표지화되지 않은 항체를 포함하지 않는 용액에서 항온처리된다. FGF21에 첫 번째 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 항온처리 후, 과잉의 결합되지 않은 항체가 제거되고, 그리고 고정된 FGF21과 연관된 표지의 양이 측정된다. 만약 고정된 FGF21과 연관된 표지의 양이 대조 표본에 비하여 검사 표본에서 실제적으로 감소되면, 이것은 두 번째 항체가 FGF21에 결합에 대해 첫 번째 항체와 경쟁한다는 것을 지시한다. 참조: Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0236] **D. 면역접합체**

[0237] 본원에서 개시된 요부는 한 가지 또는 그 이상의 세포독성 작용제, 예컨대 화학요법 작용제 또는 약물, 성장 저해제, 독소 (예를 들면, 단백질 독소, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성 독소, 또는 이들의 단편), 또는 방사성 동위원소에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체를 더욱 제공한다. 예를 들면, 개시된 요부의 항체 또는 항원 결합 부분은 하나 또는 그 이상의 다른 결합 분자, 예컨대 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체에 기능적으로 연결될 수 있다 (예를 들면, 화학적 연계, 유전자 융합, 비공유 연관 또는 다른 것에 의해).

[0238] 일정한 구체예에서, 면역접합체는 항체-약물 접합체 (ADC)인데, 여기서 항체는 메이탄시노이드 (참조: U.S. 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸라우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (참조: U.S. 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588 및 7,498,298); 돌라스타틴; 칼리키아마이신 또는 이의 유도체 (참조: U.S. 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 및 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); 및 Lode et al., *Cancer. Res.* 58:2925-2928 (1998)); 안트라사이클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (참조: Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); 및 U.S. 특허 번호 6,630,579); 메토크사트; 빈데신; 타산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 하나 또는 그 이상의 약물에 접합된다.

- [0239] 일정한 구체예에서, 면역접합체는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토타카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모디카 차란티아 (*Momordica charantia*) 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaire officinalis*) 저해제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 효소적으로 활성 독소 또는 이의 단편에 접합된 본원에서 설명된 바와 같은 항체를 포함한다.
- [0240] 일정한 구체예에서, 면역접합체는 방사접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에서 설명된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사접합체의 생산에 가용하다. 무제한적 실례는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사접합체가 검출에 이용될 때, 이것은 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들면, tc99m 또는 I123, 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상법, mri로서 또한 알려져 있음)를 위한 스핀 표지, 예컨대 요오드-123 어게인, 요오드-131, 인듐-111, 플루오르-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0241] 항체 및 세포독성 작용제의 접합체는 다양한 이중기능성 단백질 연계 작용제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜 디티오) 프로피온산염 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실산염 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이중기능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들면, 디숙신이미딜 수베르산염), 알데히드 (예를 들면, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들면, 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들면, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들면, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예를 들면, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 만들어질 수 있다. 예를 들면, 리신 면역독소는 Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)에서 설명된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지화된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오타이드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 참조: W094/11026. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "개열가능한 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티드분해효소-민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물-내포 링커 (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); U.S. 특허 번호 5,208,020)가 이용될 수 있다.
- [0242] 본원에서 개시된 면역접합체는 상업적으로 가용한 (예를 들면, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A로부터) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC 및 술포-SMPB, 그리고 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술포)벤조에이트)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 교차연결제 시약으로 제조된 이와 같은 접합체를 명시적으로 예기하지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0243] **IV. 키트**
- [0244] 본원에서 개시된 요부는 본원에서 개시된 면역검정을 수행하는 데 유용한 물질을 내포하는 키트를 더욱 제공한다. 일정한 구체예에서, 키트는 본원에서 개시된 항-FGF21 항체를 내포하는 용기를 포함한다. 적합한 용기의 무제한적 실례는 병, 시험관, 바이알 및 마이크로역가 평판을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 일정한 구체예에서, 키트는 개시된 면역검정 방법에서 항-FGF21 항체를 사용하기 위한 사용설명서를 제공하는 포장 삽입물을 추가로 포함한다.
- [0245] 일정한 구체예에서, 키트는 한 가지 또는 그 이상의 항-FGF21 항체를 내포하는 하나 또는 그 이상의 용기를 포함할 수 있다. 항-FGF21 항체의 무제한적 실례는 표 8-13 및 16-19, 그리고 도 41a 및 b에서 개시된다. 예를 들면, 하지만 제한 없이, 키트는 항-FGF21 포획 항체를 포함하는 적어도 하나의 용기 및 항-FGF21 검출 항체를 포함하는 적어도 하나의 용기를 포함할 수 있다.
- [0246] 일정한 구체예에서, 표본 내 총 FGF21 단백질을 검출하기 위한 키트는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 내포하는 첫 번째 용기, FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체를 내포하는 두 번째 용기 및 검출 작용제를 내포하는 세 번째 용기를 포함한다.
- [0247] 일정한 구체예에서, 표본 내 활성 FGF21 단백질을 검출하기 위한 키트는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 내포하는 첫 번째 용기, FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체를 내포하는 두 번째 용기 및 검출 작용제를 내포하는 세 번째 용기를 포함한다.

다.

- [0248] 일정한 구체예에서, 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 키트는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체를 내포하는 첫 번째 용기, FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체를 내포하는 두 번째 용기, FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체를 내포하는 세 번째 용기, FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체를 내포하는 네 번째 용기 및 검출 작용제를 내포하는 다섯 번째 용기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 첫 번째와 두 번째 포획 항체는 동일한 항체이고, 그리고 단일 용기에서 제공될 수 있다. 대안으로, 첫 번째와 두 번째 포획 항체는 상이한 항체이고, 그리고 별개의 용기에서 제공될 수 있다.
- [0249] 일정한 구체예에서, 포획 항체 및/또는 검출 항체는 본 발명의 키트에서 약 0.1 µg/ml 내지 약 5.0 µg/ml의 농도로 제공될 수 있다. 일정한 구체예에서, 검출 항체는 예를 들면, 비오틴으로 표지화될 수 있다.
- [0250] 일정한 구체예에서, 본 발명의 키트에서 제공되는 검출 작용제는 아비딘, 스트렙타비딘-HRP 또는 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 (SBG)일 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 키트는 테트라메틸벤지딘, 과산화수소 및/또는 레조루핀 β-D-갈락토피라노시드를 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 만약 키트가 스트렙타비딘-HRP를 포함하면, 키트는 테트라메틸벤지딘 및 과산화수소를 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 만약 키트가 SBG를 포함하면, 키트는 레조루핀 β-D-갈락토피라노시드를 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, SBG는 키트에서 약 100 pM 내지 약 400 pM의 농도로 제공될 수 있다.
- [0251] 일정한 구체예에서, 포획 항체는 고체 지지체 표면, 예컨대, 예를 들면 하지만 제한 없이, 평판 또는 비드, 예를 들면, 상자성 비드에 제공되어 부착될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 키트는 포획 항체에 연계될 수 있는 고체 지지체 표면을 추가로 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 고체 지지체는 상자성 비드일 수 있고, 그리고 약 0.1×10^7 비드/ml 내지 약 10.0×10^7 비드/ml의 농도로 제공될 수 있다.
- [0252] 대안으로 또는 부가적으로, 키트는 다른 완충액, 희석제 및 필터를 비롯하여, 상업적인 사용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 키트는 혈액 표본을 수집하고 및/또는 처리하기 위한 물질을 포함할 수 있다.
- [0253] **V. 예시적인 구체예**
- [0254] A. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 표본 내 총 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정 방법을 제공하고, 상기 면역검정 방법은
- [0255] (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계;
- [0256] (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계;
- [0257] (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계; 그리고
- [0258] (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함한다.
- [0259] A1. A의 전술한 면역검정 방법, 여기서 포획 항체 및 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0260] B. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 표본 내 활성 FGF21 단백질의 양을 결정하기 위한 면역검정 방법을 제공하고, 상기 면역검정 방법은
- [0261] (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체를 표본과 접촉시켜 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하는 단계;
- [0262] (b) 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체와 접촉시키는 단계;
- [0263] (c) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 검출 항체를 검출하는 단계; 그리고
- [0264] (d) 결합된 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계를 포함한다

다.

- [0265] C. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 면역검정 방법을 제공하고, 상기 면역검정 방법은
- [0266] (a) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하고; (ii) 첫 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체와 접촉시키고; (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 첫 번째 검출 항체를 검출하고; 그리고 (iv) 결합된 첫 번째 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 총 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계;
- [0267] (b) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체를 표본과 접촉시켜 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 산출하고; (ii) 두 번째 표본-포획 항체 조합 물질을 FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체와 접촉시키고; (iii) 표본-포획 항체 조합 물질에 결합된 두 번째 검출 항체를 검출하고; 그리고 (iv) 결합된 두 번째 검출 항체의 수준에 기초하여 표본 내 존재하는 활성 FGF21 단백질의 양을 계산하는 단계; 그리고
- [0268] (c) 단계 (a)에 의해 결정된 총 FGF21 단백질의 양을 단계 (b)에 의해 결정된 대로의 활성 FGF21 단백질의 양과 비교하여, 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하는 단계.
- [0269] C1. C의 전술한 면역검정 방법, 여기서 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체는 동일한 항체이다.
- [0270] C2. C의 전술한 면역검정 방법, 여기서 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0271] C3. A-C2 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 면역검정은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)이다.
- [0272] C4. A-C3 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 상자성 비드에 고정된다.
- [0273] C5. A-C4 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 검출 항체, 첫 번째 검출 항체 및 두 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 비오틴에 접합된다.
- [0274] C6. A-C5 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합한다.
- [0275] C7. A 및 C-C6 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 K_d 로 FGF21에 결합한다.
- [0276] C8. A-C7 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 표본은 혈액 표본이다.
- [0277] C9. A-C7 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 표본은 혈장 표본이다.
- [0278] C10. A-C9 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 상기 방법은 약 2 pg/ml 내지 약 20 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다.
- [0279] C11. A-C9 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 상기 면역검정 방법은 단일 분자 검출 기기를 이용하여 수행된다.
- [0280] C12. C11의 전술한 면역검정 방법, 여기서 단일 분자 검출 기기는 Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™이다.
- [0281] C13. C11 및 C12의 전술한 면역검정 방법, 여기서 상기 방법은 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다.
- [0282] C14. A-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0283] (a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0284] (b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변

영역 CDR2 도메인;

- [0285] (c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0286] (d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0287] (e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0288] (f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0289] C15. A-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0290] (a) 서열 번호: 54, 55, 74 및 75로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0291] (b) 서열 번호: 50, 51, 70 및 71로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0292] C16. A-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0293] (a) 서열 번호: 22, 23, 66 및 67로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0294] (b) 서열 번호: 18, 19, 62 및 63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0295] C17. A 및 C-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0296] (a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0297] (b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0298] (c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0299] (d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0300] (e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0301] (f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0302] C18. A 및 C-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0303] (a) 서열 번호: 56, 57, 72 및 73으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0304] (b) 서열 번호: 52, 53, 68 및 69로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0305] C19. A 및 C-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지

또는 그 이상은

- [0306] (a) 서열 번호: 24, 25, 64 및 65로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0307] (b) 서열 번호: 20, 21, 60 및 61로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0308] C20. C14의 전술한 번역검정 방법, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0309] (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0310] (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0311] (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0312] (d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0313] (e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0314] (f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0315] C21. C20의 전술한 번역검정, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0316] (a) 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0317] (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0318] C22. C21의 전술한 번역검정, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0319] (a) 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0320] (b) 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0321] C23. C17의 전술한 번역검정 방법, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0322] (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0323] (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0324] (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0325] (d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0326] (e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0327] (f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0328] C24. C23의 전술한 번역검정, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0329] (a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0330] (b) 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0331] C25. C24의 전술한 번역검정, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0332] (a) 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0333] (b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0334] C26. A-C13 중에서 한 가지의 전술한 번역검정 방법, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합한다:
- [0335] (a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

- [0336] (b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0337] (c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0338] (d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0339] (e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0340] (f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.
- [0341] C27. A 및 C-C13 중에서 한 가지의 전술한 면역검정 방법, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합한다:
- [0342] (a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0343] (b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0344] (c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0345] (d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0346] (e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0347] (f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.
- [0348] D. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 표본 내 총 FGF21 단백질을 검출하기 위한 키트를 제공하고, 상기 키트는
- [0349] (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체;
- [0350] (b) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체; 그리고
- [0351] (c) 검출 작용제를 포함한다.
- [0352] D1. D의 전술한 키트, 여기서 포획 항체 및 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0353] E. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 표본 내 활성 FGF21 단백질을 검출하기 위한 키트를 제공하고, 상기 키트는
- [0354] (a) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 포획 항체;
- [0355] (b) FGF21의 아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 검출 항체; 그리고
- [0356] (c) 검출 작용제를 포함한다.
- [0357] F. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 표본 내 활성 FGF21 단백질 대 총 FGF21 단백질의 비율을 결정하기 위한 키트를 제공하고, 상기 키트는
- [0358] (a) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 포획 항체 및 (ii) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 첫 번째 검출 항체;
- [0359] (b) (i) FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 포획 항체 및 (ii) FGF21의

아미노산 잔기 173-182 내에 존재하는 에피토프에 결합하는 두 번째 검출 항체; 그리고

(c) 하나 또는 그 이상의 검출 작용제를 포함한다.

F1. F의 전술한 키트, 여기서 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체는 동일한 항체이다.

F2. F의 전술한 키트, 여기서 첫 번째 포획 항체 및 첫 번째 검출 항체는 FGF21의 아미노산 잔기 5-172 내에 상이한 에피토프에 결합한다.

F3. D-F2 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 상자성 비드에 고정된다.

F4. D-F3 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체, 첫 번째 검출 항체 및 두 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 비오틴에 접합된다.

F5. D-F4 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 작용제는 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 접합체, 스트렙타비딘-양고추냉이 과산화효소 접합체, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.

F6. 레조루핀 β-D-갈락토피라노시드, 테트라메틸벤지딘, 과산화수소 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 F5의 전술한 키트.

F7. D-F6 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 Kd로 FGF21에 결합한다.

F8. D 및 F-F7 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 약 10^{-10} M 내지 10^{-13} M의 Kd로 FGF21에 결합한다.

F9. D 및 F-F8 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 또는 첫 번째 검출 항체는 약 0.1 μg/ml 내지 약 1 μg/ml의 농도를 갖는다.

F10. E-F7 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 또는 두 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 약 1 μg/ml 내지 약 3 μg/ml의 농도를 갖는다.

F11. F5의 전술한 키트, 여기서 스트렙타비딘-β-D-갈락토피라노오스 접합체는 약 100 pM 내지 약 400 pM의 농도를 갖는다.

F12. D-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은

(a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

(b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;

(c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;

(d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;

(e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고

(f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.

F13. D-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은

(a) 서열 번호: 54, 55, 74 및 75로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고

- [0381] (b) 서열 번호: 50, 51, 70 및 71로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0382] F14. D-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0383] (a) 서열 번호: 22, 23, 66 및 67로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0384] (b) 서열 번호: 18, 19, 62 및 63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0385] F15. D 및 F-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0386] (a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0387] (b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0388] (c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0389] (d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0390] (e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0391] (f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0392] F16. D 및 F-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0393] (a) 서열 번호: 56, 57, 72 및 73으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0394] (b) 서열 번호: 52, 53, 68 및 69로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0395] F17. D 및 F-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0396] (a) 서열 번호: 24, 25, 64 및 65로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0397] (b) 서열 번호: 20, 21, 60 및 61로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0398] F18. F12의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0399] (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0400] (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0401] (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0402] (d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0403] (e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고

- [0404] (f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0405] F19. F18의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0406] (a) 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0407] (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0408] F20. F19의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0409] (a) 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0410] (b) 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0411] F21. F15의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0412] (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0413] (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0414] (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0415] (d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0416] (e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0417] (f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0418] F22. F21의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0419] (a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0420] (b) 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0421] F23. F22의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은
- [0422] (a) 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0423] (b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0424] F24. D-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 포획 항체, 첫 번째 포획 항체 및 두 번째 포획 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합한다:
- [0425] (a) 서열 번호: 26 및 27로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0426] (b) 서열 번호: 30 및 31로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0427] (c) 서열 번호: 34 및 35로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0428] (d) 서열 번호: 38 및 39로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0429] (e) 서열 번호: 42 및 43으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0430] (f) 서열 번호: 46 및 47로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.
- [0431] F25. D 및 F-F11 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 검출 항체 및 첫 번째 검출 항체 중에서 한 가지 또는 그 이상은 하기를 포함하는 항체와 경쟁적으로 결합한다:
- [0432] (a) 서열 번호: 28 및 29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변

영역 CDR1;

- [0433] (b) 서열 번호: 32 및 33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0434] (c) 서열 번호: 36 및 37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0435] (d) 서열 번호: 40 및 41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0436] (e) 서열 번호: 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0437] (f) 서열 번호: 48 및 49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인.
- [0438] F26. D-F25 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 표본은 혈액 표본이다.
- [0439] F27. D-F25 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 표본은 혈장 표본이다.
- [0440] F28. D-F27 중에서 한 가지의 전술한 키트, 여기서 상기 키트는 약 0.2 pg/ml 내지 약 0.5 pg/ml의 웰내 민감도에서 표본 내 총 또는 활성 FGF21 단백질의 양을 검출한다.
- [0441] G. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 단리된 항-FGF21 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공하고, 상기 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0442] (a) 서열 번호: 26-29로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0443] (b) 서열 번호: 30-33으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0444] (c) 서열 번호: 34-37로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0445] (d) 서열 번호: 38-41로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0446] (e) 서열 번호: 42-45로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0447] (f) 서열 번호: 46-49로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0448] G1. G의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0449] (a) 서열 번호: 26의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0450] (b) 서열 번호: 30의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0451] (c) 서열 번호: 34의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0452] (d) 서열 번호: 38의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0453] (e) 서열 번호: 42의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0454] (f) 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0455] G2. G의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0456] (a) 서열 번호: 27의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0457] (b) 서열 번호: 31의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0458] (c) 서열 번호: 35의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;

- [0459] (d) 서열 번호: 39의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0460] (e) 서열 번호: 43의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0461] (f) 서열 번호: 47의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0462] G3. G의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0463] (a) 서열 번호: 28의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0464] (b) 서열 번호: 32의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0465] (c) 서열 번호: 36의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0466] (d) 서열 번호: 40의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0467] (e) 서열 번호: 44의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0468] (f) 서열 번호: 48의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0469] G4. G의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0470] (a) 서열 번호: 29의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0471] (b) 서열 번호: 33의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 도메인;
- [0472] (c) 서열 번호: 37의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 도메인;
- [0473] (d) 서열 번호: 41의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 도메인;
- [0474] (e) 서열 번호: 45의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 도메인; 그리고
- [0475] (f) 서열 번호: 49의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0476] G5. G1의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0477] (a) 서열 번호: 54의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0478] (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0479] G6. G2의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0480] (a) 서열 번호: 55의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0481] (b) 서열 번호: 51의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0482] G7. G3의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0483] (a) 서열 번호: 56의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0484] (b) 서열 번호: 52의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0485] G8. G4의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0486] (a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0487] (b) 서열 번호: 53의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0488] G9. G1의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0489] (a) 서열 번호: 75의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0490] (b) 서열 번호: 71의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0491] G10. G2의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0492] (a) 서열 번호: 74의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0493] (b) 서열 번호: 70의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0494] G11. G3의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은

- [0495] (a) 서열 번호: 73의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0496] (b) 서열 번호: 69의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0497] G12. G4의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0498] (a) 서열 번호: 72의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0499] (b) 서열 번호: 68의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0500] G13. G5의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0501] (a) 서열 번호: 22의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0502] (b) 서열 번호: 18의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0503] G14. G6의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0504] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0505] (b) 서열 번호: 19의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0506] G15. G7의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0507] (a) 서열 번호: 24의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0508] (b) 서열 번호: 20의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0509] G16. G8의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0510] (a) 서열 번호: 25의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0511] (b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0512] G17. G9의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0513] (a) 서열 번호: 67의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0514] (b) 서열 번호: 63의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0515] G18. G10의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0516] (a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0517] (b) 서열 번호: 62의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0518] G19. G11의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0519] (a) 서열 번호: 65의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0520] (b) 서열 번호: 61의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0521] G20. G12의 전술한 단리된 항체, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분은
- [0522] (a) 서열 번호: 64의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 중쇄; 그리고
- [0523] (b) 서열 번호: 60의 아미노산 서열 및 이의 보존성 치환을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0524] H. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 G-G20 중에서 한 가지의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0525] I. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 H의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0526] J. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 항체가 생산되도록 I의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0527] J1. 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는, J의 전술한 방법.
- [0528] K. 일정한 무제한적 구체예에서, 본원에서 개시된 요부는 G-G20 중에서 한 가지의 하나 또는 그 이상의 항체 또

는 이들의 항원 결합 부분을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0529] **실시예**

[0530] 하기 실시예는 본원에서 개시된 요부를 단지 예시하고, 그리고 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 고려되지 않아야 한다.

[0531] **실시예 1: 항-FGF21 항체 산출**

[0532] SJL 및 Balb/c 생쥐를 재조합 인간 FGF21로 면역화함으로써 단일클론 항체가 산출되었다. 80개의 하이브리도마 상층액이 ELISA에 의해 선별검사되었다 (도 1). 무손상 인간 FGF21 (PUR 98271), 무손상 시노몰구스 FGF21 (PUR 98270), 그리고 무손상 인간 FGF21을 인간 FAP에 의해 소화시킴으로써 산출된 개열된 인간 FGF21 (PUR 102247)에 결합에 기초하여 20개의 하이브리도마가 선별되었다.

[0533] **실시예 2: 항-FGF21 항체 특징화**

[0534] 실시예 1에서 확인된 선별된 20개의 하이브리도마로부터 획득된 IgG는 ELISA에 의해 더욱 특징화되었다. ELISA는 하기와 같이 수행되었다: 96 웰 MaxiSorp 평판 (439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY)이 4°C에서 하룻밤 동안 코팅 완충액 (50 mM 탄산나트륨, pH 9.6)에서 1 µg/mL의 항-FGF21 mAbs 또는 항-FGF21 양 pAbs (카탈로그 번호 RD184108100, Biovendor, Asheville, NC)로 코팅되었다. 그 다음 날에, 0.5% BSA 및 10 ppm 프로클린 pH 7.4를 내포하는 PBS로 차단하고, 그리고 세척 완충액 (PBS, 0.05% Tween 20, pH7.2)으로 세척한 후, 평판이 실온에서 1-2 시간 동안 검정 완충액 (25 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.2 mM CaCl₂, 0.1% 소 혈청 알부민 (BSA), 0.05% Tween 20)에서 0.00000186-2000 pg/mL의 무손상 인간 FGF21 (전장, 개열되지 않은 FGF21; 카탈로그 번호 2539-FG, R&D Systems) 또는 FAP-개열된 인간 FGF21과 함께 항온처리되었다. 세척 완충액으로 세척한 후, 평판이 실온에서 1-2 시간 동안 0.5 µg/mL의 이차 항체 (R&D Systems, 비오틴화된 염소 항-FGF21 pAb BAF2539)와 함께 항온처리되었다. 세척 완충액으로 세척한 후, 평판이 검정 완충액에서 1:1,000 희석된 높은 민감도 스트렙타비딘-HRP (PIERCE 카탈로그 번호 21130)와 함께 항온처리되었다. 세척 완충액으로 세척한 후, 기질 3, 3', 5, 5' 테트라메틸 벤지딘 (TMBE 1000, Moss; Pasadena, MD)을 첨가함으로써, 재조합 FGF21에 항-FGF21의 결합이 사정되었다. 이중 웰로부터 평균 흡광도 값이 항체 농도의 함수로서 플롯팅되었고, 그리고 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)을 이용하여 각 항체에 대한 반극대 효과적인 농도 (EC₅₀) 값을 계산하기 위해, 데이터가 3 파라미터 방정식에 적합되었다 (표 2).

[0535] 표 2. 각 FGF21 항체에 대한 EC₅₀ 값.

표 2

[0536]

일차 Ab	이차 Ab	무손상 FGF21 EC ₅₀ (pg/ml)	개열된 FGF21 EC ₅₀ (pg/ml)	EC ₅₀ 비율 (개열된 /무손상)
mAb1	염소 항-FGF21 pAb	126	228	1.8
mAb2	염소 항-FGF21 pAb	2108	3187	1.5
mAb3	염소 항-FGF21 pAb	292	450	1.5
mAb4	염소 항-FGF21 pAb	90	170	1.9
mAb5	염소 항-FGF21 pAb	5506	19331	3.5
mAb6	염소 항-FGF21 pAb	1993	4813	2.4
mAb7	염소 항-FGF21 pAb	8797	25403	2.9
mAb8	염소 항-FGF21 pAb	503	777	1.5
mAb9	염소 항-FGF21 pAb	855	1385	1.6
mAb10	염소 항-FGF21 pAb	136	249	1.8
mAb11	염소 항-FGF21 pAb	149	318	2.1
mAb12	염소 항-FGF21 pAb	5633	30386	5.4
mAb13	염소 항-FGF21 pAb	169	300	1.8
양 pAb	염소 항-FGF21 pAb	48	84	1.7

[0537] 무손상 대 개열된 FGF21의 차별적 검출 및 절대적 EC₅₀ 값에 기초하여, 항체 mAb5, mAb6, mAb7 및 mAb12가 추가 분석으로부터 배제되었다. 항체 mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb8, mAb9, mAb10, mAb11, mAb13, mAb15 및 mAb16이 EZ-Link™ NHS-PEG 고체상 비오틴화 키트 (PIERCE 카탈로그 번호 21450)를 이용함으로써 비오틴화되었고, 그리

고 샌드위치 ELISA가 무손상 FGF21을 이용한 쌍별 조합 방식으로 수행되었다 (표 3 및 4). 비오틴화된 염소 항-FGF21 pAb BAF2539 (R&D Systems)가 양성 대조로서 이용되었다.

[0538] 표 3. 샌드위치 ELISA에서 항-FGF21 mAbs의 양립성.

표 3

[0539]

	BIO-1	BIO-10	BIO-11	BIO-4	BIO-9	BIO-13	BIO-2	BIO-3	BIO-8	BAF2539
mAb1				XX	XX					XX
mAb10				XX	XX	X				XX
mAb11				XX	XX	X				XX
mAb4	XX	XX	XX							XX
mAb9	XX	XX	XX							XX
mAb13	X	X	X							XX
mAb8	XX	XX	XX	XX		X		X		XX
mAb2										XX
mAb3										XX
양 pAb										XX

[0540] XX: OD>1인 강한 신호, X: OD<1인 강한 신호

[0541] 표 4. 샌드위치 ELISA에서 항-FGF21 mAbs의 양립성.

표 4

[0542]

	BIO-4	BIO-11	BIO-15	BIO-16
mAb4		XX	XX	X
mAb8	-	-	-	
mAb9		XX	XX	X
mAb11	XX		XX	
mAb15	XX	X		
mAb16	-			

[0543] XX: OD>1.5인 강한 신호, X: 0.5<OD<1.5인 강한 신호, -: 653 pg/mL FGF21이 이용될 때 OD<0.5. 무손상 FGF21 및 FAP-개열된 FGF21의 평균 값이 상기 표를 산출하는 데 이용되었다.

[0544] 표 3에서 제공된 결과에 기초하여, 항체 mAb2, 3 및 13이 추가 분석으로부터 배제되었다. 표 3으로부터 결과는 항체 mAb1, 4, 8, 9, 10 및 11을 3가지 에피토프 빈 내로 위치시켰다 (표 5).

[0545] 표 5. 에피토프 비닝.

표 5

[0546]

에피토프 빈	mAb
1	1, 10, 11
2	4, 9
3	8

[0547] 항체 mAb1, 4, 8, 9, 10 및 11은 이후, 무손상 인간 FGF21 (카탈로그 번호 2539-FG, R&D Systems)을 이용한 ELISA에서 조합 방식으로 검사되었다. 흡광도 값이 항체 농도의 함수로서 플롯팅되었고, 그리고 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)을 이용하여 각 항체에 대한 반극대 효과적인 농도 (EC₅₀) 값을 계산하기 위해, 데이터가 3 파라미터 방정식에 적합되었다 (표 6). 표 6에서 도시된 바와 같이, 항체 mAb4 또는 9가 포획 항체로서 이용되고, 그리고 항체 mAb10 또는 11이 무손상 인간 FGF21에 대한 검출 항체로서 이용될 때 더욱 우수한 효능이 관찰되었다.

[0548] 표 6. 샌드위치 ELISA에서 다양한 항-FGF21 mAb 조합에서 EC₅₀ 값.

표 6

[0549]

포획 mAb	검출 mAb	EC ₅₀ (pg/ml)
4	10	108
4	11	133
9	11	156
9	10	161
11	4	161
10	4	172
8	10+4	182
10	9	191
4	1	193
11	9	195
8	11+4	198
8	1+4	202
1	4	222
8	4	228
8	10	237
9	1	249
8	11	303
8	1	308
1	9	323

[0550] 항체 mAb4, 8, 9, 10, 11, 15 및 16은 이후, 무손상 인간 FGF21 (카탈로그 번호 2539-FG, R&D systems) 또는 FAP-개열된 인간 FGF21을 이용한 ELISA에서 조합 방식으로 검사되었다. 흡광도 값이 항체 농도의 함수로서 플롯팅되었고, 그리고 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)을 이용하여 각 항체에 대해, 데이터가 3 파라미터 방정식에 적합되었다. 가장 일관된 결과는 항체 mAb4 또는 9가 포획 항체로서 이용되고, 그리고 항체 mAb11 또는 mAb15가 검출 항체로서 이용될 때 관찰되었다 (도 2 및 표 7). 이런 이유로, mAb8 및 16이 추가 분석으로부터 배제되었다. 도 2는 이들 항체가 무손상 및 FAP-개열된 FGF21 (cFGF21)에 동등하게 결합한다는 것을 보여주는데, 이것은 총 FGF21 (다시 말하면, 무손상 및 FAP-개열된 둘 모두)의 농도를 검출하는 데 중요하다.

[0551] 표 7. 샌드위치 ELISA에서 다양한 항-FGF21 mAb 조합에서 EC₅₀ 값.

표 7

[0552]

포획 mAb	검출 mAb	무손상 FGF21에서 EC ₅₀ (pg/ml)	FAP-개열된 FGF21에서 EC ₅₀ (pg/ml)
9	11	165.8	156.3
4	11	194.7	148
11	4	204.5	203.8
4	15	232.1	262.6
9	15	431.4	362.6
15	4	536.8	561.7
11	15	774.4	630.1
4	16	1246	7044
15	11	1388	1239
9	16	1451	6234
16	4	4893	15750
8	11	40272	106195
8	15	42549	78857
8	4	44411	121300000

[0553] 항체 mAb4, 9, 11 및 15는 K_d를 결정하기 위해, BIACORE[®] 표면 플라즈몬 공명에 의해 더욱 분석되었다. 도 3에

서 도시된 바와 같이, mAb4는 3.689×10^{10} 의 K_d 를 갖고, mAb9는 8.895×10^{10} 의 K_d 를 갖고, mAb11은 2.704×10^{10} 의 K_d 를 갖고, 그리고 mAb15는 3.955×10^{12} 의 K_d 를 갖는다.

[0554] 실시예 3: 에피토프 분석

[0555] FGF19, FGF21 또는 FGF19-FGF21 키메라 단백질을 일시적으로 형질감염된 HEK293 배양 상층액에서 FLAG-태깅된 단백질을 발현하고, 그리고 항체 mAb4, 9, 11 및 15의 결합을 ELISA에 의해 검사함으로써 에피토프 지도화가 수행되었다. ELISA를 위해, 96 웰 MaxiSorp 평판 (439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY)이 4 °C에서 하룻밤 동안, 분비된 단백질을 내포하는 15 µl 배양 상층액 및 135 µl의 1x 코팅 완충액 (50 mM 탄산나트륨, pH 9.6)의 혼합물로 코팅되었다. FGF21의 C 말단에 결합하는 상업적인 항체 R5 및 R9가 양성 대조로서 이용되었다.

[0556] 인간 FGF19:

[0557] RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번
호: 2)

[0558] 인간 FGF21:

[0559] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHPLGNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 1)

[0560] 인간 FGF21-19 키메라 단백질 (FGF21 부분은 이탤릭체로 표시되고, 그리고 FGF19 부분은 밑줄 표시된다):

[0561] HPIPDSSPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번
호: 3)

[0562] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 4)

[0563] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 5)

[0564] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 6)

[0565] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 7)

[0566] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 8)

[0567] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 9)

[0568] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHPLGNKSPHRDPAPRGPAPFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 10)

[0569] RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHPLGNKSPHRDPAPRGPAPFLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 11)

[0570] RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (서열 번호: 12)

[0571] RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYQSEAHGLPLHPLGNKSPHRDPAPRGPAPFLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 13)

[0572] RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE
IRPDGYNVYQSEAHGLPLHPLGNKSPHRDPAPRGPAPFLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 14)

LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDLPMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 14)

[0573] RPLAFSDAGPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLQLKALKPGVTIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRE
LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDLPMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 15)

[0574] RPLAFSDAGPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVLRITVAIKGVHSVRYLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRE
LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDLPMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 16)

[0575] RPLAFSDAGPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVLRITVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEEDCAFE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGLPLSHFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSDDLPMVGPSQGRSPSYAS (서열 번호: 17)

[0576] 도 4에서 도시된 바와 같이, 항체 mAb4, 9, 11 및 15는 인간 FGF21의 코어 FGF 접합에 결합하고, 그리고 N 말단 또는 C 말단 유연성 영역에 결합하지 않는다.

[0577] **실시예 4: FGF21 ELISA 검정**

[0578] EZ-Link™ NHS-PEG 고체상 비오틴화 키트 (PIERCE #21450)를 이용함으로써 비오틴화된 C 말단 특이적 항-FGF21 pAb (카탈로그 번호 30661, Epitope Diagnostics, San Diego, CA; 본원에서 "C-ter pAb")로서 또한 지칭됨)와 조합으로, 무손상 FGF21의 검출에서 포획 항체로서 mAb4 및 11 항체의 유용성이 검사되었다. 총 FGF21 및 활성 FGF21 수준을 결정하기 위한 면역검정의 계통도는 도 5에서 도시된다.

[0579] ELISA 검정은 하기와 같이 수행되었다: 96 웰 MaxiSorp 평판 (카탈로그 번호 439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY)이 4 °C에서 하룻밤 동안 코팅 완충액 (50 mM 탄산나트륨, pH 9.6)에서 0.5 µg/mL의 항-FGF21 mAbs로 코팅되었다. 그 다음 날에, 0.5% BSA 및 10ppm 프로클린 pH 7.4를 내포하는 PBS로 차단하고, 그리고 세척 완충액 (PBS, 0.05% Tween 20, pH7.2)으로 세척한 후, 평판이 실온에서 1-2 시간 동안 검정 완충액 (25 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.2 mM CaCl₂, 0.1% 소 혈청 알부민 [BSA], 0.05% Tween-20)에서 0.0004-32000 pg/mL의 무손상 인간 FGF21 (2539-FG, R&D systems)와 함께 항온처리되었다. 세척 완충액으로 세척한 후, 평판이 실온에서 1-2 시간 동안 Magic 완충액 (1X PBS pH 7.4, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.2% BgG, 0.25% CHAPS, 5mM EDTA, 0.35M NaCl, 10PPM 프로클린)에서 0.5 µg/ml의 이차 Ab (비오틴화된 항-FGF21 C 말단 pAb 30661 또는 항-FGF21 mAb11 또는 15)와 함께 항온처리되었다. 세척 완충액으로 세척한 후, 평판이 검정 완충액에서 1:1,000 희석된 높은 민감도 스트렙타비딘-HRP (PIERCE #21130)와 함께 항온처리되었다. 세척 완충액으로 세척한 후, 기질 3, 3', 5, 5'-테트라메틸 벤지딘 (TMBE-1000, Moss; Pasadena, MD)을 첨가함으로써 재조합 FGF21에 항-FGF21의 결합이 사정되었다. 더욱 상세한 프로토콜은 도 6에서 제공된다. 이중 웰로부터 평균 흡광도 값이 항체 농도의 함수로서 플롯팅되었고, 그리고 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)을 이용하여 데이터가 3-파라미터 방정식에 적합되었다 (도 7).

[0580] 도 8에서 도시된 바와 같이, 총 FGF21 ELISA 검정은 5 pg/ml의 웰내 민감도를 가졌고, 그리고 활성 FGF21 ELISA 검정은 28 pg/ml의 웰내 민감도를 가졌다. 활성 FGF21 ELISA 검정은 마지막 10개의 C 말단 아미노산을 결여하는 FGF21의 개열된 형태를 검출하지 못하였다.

[0581] 총 FGF21 ELISA 검정에 대한 혈청의 효과를 결정하기 위한 추가 실험이 수행되었다. 포획 항체로서 mAb4 및 검출 항체로서 mAb15를 이용한 FGF21 ELISA 검정이 수행되었다. 도 9에서 도시된 바와 같이, 상기 검정에 대한 최소한의 혈청 간섭이 있었다. 인간 FGF21에 대한 상기 검정의 특이성이 또한 검사되었다. 도 9에서 도시된 바와 같이, 총 FGF21에 대한 검정은 대조 생쥐와 비교하여 인간-FGF21 녹인 생쥐에서 발현되는 인간 FGF21을 검출하였다. 도 10 역시 이들 개시된 항체를 이용하는 검정이 인간 FGF21에 대해 특이적이고 생쥐 FGF21을 검출하지 못하였다는 것을 보여준다.

[0582] 이들 데이터에 기초하여, 4가지 항체, mAb4, mAb9, mAb11 및 mAb15가 재조합 발현을 위한 cDNA 클로닝을 위해 선택되었다. 이들 항체의 아미노산 서열은 표 8-13, 그리고 도 41a 및 41b에서 제공된다. 재조합 mAbs는 뮤린 IgG2a 배경에서 100 mL CHO 배양액에서 발현되었다.

[0583] 표 8. 뮤린 항-FGF21 단일클론 항체에 대한 전장 경쇄 (LC) 서열.

표 8

[0584]

항체	전장 경쇄 아미노산 서열
4	QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEADAATYYCHQYHRSPPTWTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVK WKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열 번호: 18)
9	DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNIRTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKI NSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열 번호: 19)
11	QIVLTQSPALMSASPGERVTMTCSAGSSVSYMYWYQQKPRSSPKWIYLTSLNASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS SMEAEADAATYYCQWSSNPRTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열 번호: 20)
15	DVLTMTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIHVNNGDYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVYTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN VKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열 번호: 21)

[0585] 표 9. 무린 항-FGF21 단일클론 항체에 대한 전장 중쇄 (HC) 서열.

표 9

[0586]

항체	전장 중쇄 아미노산 서열
4	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISTGGGYTYYPDSVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHDLVDWYFDVWGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDIT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPITVCVVVDVSEDDPDVQ ISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRV EKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열 번호: 22)
9	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYFTDYYMGWVKQSHGKLEWIGDINPNNGVITINNQNFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGGYGGALDYWGQGTSTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPITVCVVVDVSEDDPDVQIS WVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열 번호: 23)
11	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTNYGSIWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSDNTYYNEFKGKAT LTADKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYFCTRSYGGFFDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPITVCVVVDVSEDDPDVQIS WVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열 번호: 24)
15	QVQLIQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTGYAIHWVRQSPGKLEWLGMIWKSNGTDYNAAFMSRLSI TKDNKSKQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDYEFVYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPITVCVVVDVSEDDPDVQIS WVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열 번호: 25)

[0587] 표 10. 무린 항-FGF21 단일클론 항체에 대한 경쇄 가변 영역 (VL) 서열.

표 10

[0588]

항체	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
4	QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEADAATYYCHQYHRSPPTWTFGGGKLEIK (서열 번 호: 50)

9	DIQMTQSPASLSASVGETVITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNIRTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGKLEIK (서열 번호: 51)
11	QIVLTQSPALMSASPGERVMTCSAGSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIVLTSLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGKLEIK (서열 번호: 52)
15	DVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGKLEIK (서열 번호: 53)

표 11. 뮤린 항-FGF21 단일클론 항체에 대한 중쇄 가변 영역 (VH) 서열.

표 11

항체	중쇄 가변 영역 아미노산 서열
4	EVKLVESSGDLVKPGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISTGGGYTYYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRSEDTAMYYCARHDLVDWYFDVWGTTTVTVSS (서열 번호: 54)
9	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGVTINNQN FKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGGYGGALDYWGQGTSTVTVSS (서열 번 호: 55)
11	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEYIPRSDNTYYNEK FKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYGGFDYWGQGTTLTVSS (서열 번 호: 56)
15	QVQLIQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTGYAIIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKSNGTDYNAAF MSRLSITKDNSKSKVFFKMNLSLQADDTAIIYCARNGYDYEFVYWGQGTTLTVSA (서열 번 호: 57)

표 12. 뮤린 항-FGF21 단일클론 항체에 대한 중쇄 CDR 서열.

표 12

항체	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4	SYGMS (서열 번호: 26)	TISTGGGYTYYPDSVKG (서열 번 호: 30)	HDLVDWYFDV (서열 번 호: 34)
9	DYYMG (서열 번호: 27)	DINPNNGVTINNQNFKG (서열 번 호: 31)	GYGGALDY (서열 번호: 35)
11	NYGIS (서열 번호: 28)	EIYPRSDNTYYNEKFKG (서열 번 호: 32)	SDYGGFDY (서열 번호: 36)
15	GYAIH (서열 번호: 29)	MIWKSNGTDYNAAFMS (서열 번 호: 33)	NGYDYEFVY (서열 번 호: 37)

표 13. 뮤린 항-FGF21 단일클론 항체에 대한 경쇄 CDR 서열.

표 13

항체	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4	TASSSVSSSYLH (서열 번호: 38)	RTTNLAS (서열 번호: 42)	HQYHRSPPTWT (서열 번 호: 46)
9	RASENIYSYLA (서열 번호: 39)	NIRTLAE (서열 번호: 43)	QHHYDSPWT (서열 번호: 47)
11	SAGSSVSYMY (서열 번호: 40)	LTSNLAS (서열 번호: 44)	QQWSSNPRT (서열 번호: 48)
15	RSSQIIVHNNGDTYLE (서열 번호: 41)	KISNRFs (서열 번호: 45)	FQGSHPVPT (서열 번호: 49)

실시예 5: FGF21 ELISA 검정의 최적화

실시예 4에서 설명된 FGF21 ELISA 검정은 상기 검정의 민감도를 향상시키기 위해 더욱 최적화되었다.

- [0597] 어떤 포획 항체가 더욱 우수한 검출을 유발하는 지를 결정하기 위해 상이한 포획 항체가 비교되었다. 항체 mAb4 및 mAb9 둘 모두 포획 항체로서 검사되었다. 도 11에서 도시된 바와 같이, mAb9와 비교하여 mAb4를 포획 항체로서 이용하여 더욱 우수한 검정 민감도가 획득되었다.
- [0598] 고정 농도의 검출 항체에서 상이한 유형의 코팅 완충액 및 상이한 농도의 코팅 항체가 총 FGF21 검정 및 활성 FGF21 검정을 위해 분석되었다. 중탄산염 코팅 완충액 및 PBS 코팅 완충액이 상이한 코팅 항체 농도에서 분석되었다. 도 12에서 도시된 바와 같이, 총 FGF21 검정의 경우에, 심지어 상이한 농도의 코팅 항체에서도 중탄산나트륨 및 PBS 코팅 완충액에 대해 유사한 웰내 민감도가 관찰되었다. 예를 들면, PBS에서 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 코팅 mAb4는 2 pg/ml 의 웰내 민감도를 가졌고, 그리고 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 코팅 mAb4는 3 pg/ml 의 웰내 민감도를 가졌다.
- [0599] 활성 FGF21 검정의 경우에, 중탄산나트륨 및 PBS 코팅 완충액에 대해 유사한 웰내 민감도가 관찰되었다 (도 13).
- [0600] 총 FGF21 검정의 민감도에 대한 검출 항체 (mAb15)의 농도 및 양고추냉이 과산화물 (HRP)의 농도의 효과를 결정하기 위한 추가 실험이 수행되었다. 검출 항체에 대해 0.2, 1 및 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 검사되었고, 그리고 HRP에 대해 1/100 및 1/500의 희석이 검사되었다. 도 14에서 도시된 바와 같이, 더욱 높은 농도의 검출 항체 및 HRP는 이들 검정의 민감도를 유의미하게 향상시키지 못하였다.
- [0601] **실시예 6: Quanterix Simoa를 이용한 FGF21 검출 검정**
- [0602] 실시예 5에서 논의된 바와 같이, ELISA 형식으로부터 최적화에 기초하여, Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™을 이용하는 검정이 포획 항체로서 mAb4, 그리고 검출 항체로서 비오틴화된 mAb15 (총 FGF21을 검출하기 위한) 또는 비오틴화된 C-ter pAb (활성 FGF21을 검출하기 위한) 중에서 어느 한 가지를 이용하도록 조정되었다. 상기 검정의 계통도는 도 15에서 도시된다.
- [0603] 상기 면역검정의 요약이 제공된다. Quanterix Simoa 면역검정은 2-단계 검정 프로토콜을 이용한, 총 FGF21의 포획 및 효소 접합체 (스트렙타비딘 β -갈락토시다아제 (SBG))로 표지화로 시작된다 (도 16). 첫 번째 단계에서 포획된 피분석물 샌드위치를 형성하기 위해, mAb4에 접합된 자성 비드로 포획된 총 FGF21 및 비오틴화된 검출 항체 (총 FGF21의 경우 mAb15-비오틴 또는 활성 FGF21의 경우 C-ter pAb-비오틴 중에서 어느 한 가지)가 함께 첨가되고, 이후 두 번째 단계에서 검출을 위해 SBG가 첨가된다. 각 단계 사이에, 비드가 세척된다. 각 세척 주기 동안, 상기 기기는 상층액의 자동화된 흡인 전, 자석을 이용하여 비드를 펠렛팅한다. 최종 세척 주기 후, 포획 비드가 레조루핀 β -D-갈락토피라노시드 (RGP) 기질에서 재현탁된다. 이들 비드는 이후, 영상화 및 피분석물 정량에 대비하여 Simoa Disc의 진입 포트에 이전된다.
- [0604] FGF21의 포획과 표지화 후, 웰마다 단지 하나의 비드 (4.25 μm 너비, 3.25 μm 깊이)만을 유지하도록 크기 산정된 216,000 40-fL 웰을 내포하는 어레이 내로 포획 비드가 부하된다. 비드 현탁액이 진입 통로를 통해 및 어레이 위에 끌어당겨진다. 비드는 대략 90 초 동안 중력을 통해 웰 내로 침강하도록 허용된다. 오일의 분취량이 어레이 진입 통로에서 분여되고 어레이 위에 끌어당겨져, 마이크로웰에 비드 및 RGP 기질을 가둘 뿐만 아니라 표면으로부터 과잉 비드를 제거한다. 만약 FGF21 분자가 포획되고 표지화되면, SBG가 RGP 기질을 형광 산물 레조루핀으로 가수분해한다. 형광 산물은 밀봉된 마이크로웰 내에 쌓여, 단일 분자의 검출을 가능하게 한다.
- [0605] 멀티플렉스 포획 비드는 2-단계 EDAC 연계 프로토콜 (Simoa 홈브루 2.0 멀티플렉스 비드 코팅 프로토콜 사용자-213-11)을 이용하여 제조되었다. 비드가 0.5 mg/mL mAb4 및 0.25 mg/mL EDAC와 연계된다. 비드 상에서 항체 일차 아미노 기 및 카르복실 기 사이에 연계 반응이 일어난다.
- [0606] Quanterix Simoa 검정이 96 웰 Nunc™ 96 웰 폴리프로필렌 MicroWell™ 평판 (V-바닥, Thermo Scientific Nunc 249944, Rochester, NY)에서 수행되었다. 표준 곡선을 위해, 재조합 무손상 인간 FGF21 (iFGF21) 및 개열된 인간 FGF21 (cFGF21)이 0.200-500 pg/mL 의 Simoa 완충액 (PBS pH 7.4, 2% BSA (분획물 B, 프로테아제-없음), 0.1% Tween, 5 mM EDTA) (도 17) 또는 Magic 완충액 (BA010) (도 19-25, 28-32 및 33-37)에서 연속 희석되었다. 알려지지 않은 농도의 FGF21 (예를 들면, 혈장 또는 혈청에서)을 결정하기 위해, 검사 표본이 Simoa 완충액 또는 Magic 완충액에서 1:5-1:20 희석되었다. 필요한 권장된 시약과 함께, 검정 평판이 Simoa HD-1 분석기 내로 부하되었다. 각 웰에서, 각 반응을 위해, mAb 4에 접합된 32 μL 의 포획 비드, 1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 32 μL 의 검출 항체 (mAb15-비오틴 또는 C-ter pAb-비오틴) 및 110 μL 의 SBG가 이용되었다. 각 웰에 대해, 검정이 이중으로 수행되었다. 상기 제조업체의 디폴트 홈브루 검정이 자동화된 절차를 위한 프로그램으로서 선별되었다. 검정 프로토콜에 관한 추가 정보는 도 18에서 제공된다.

[0607] 도 19에서 도시된 바와 같이, 총 (T) FGF21 Quanterix Simoa-기초된 검정 (QSA)은 무손상 (야생형 (WT)) FGF21을 0.3 pg/ml의 웰내 민감도 (블랭크 웰의 2 x 평균 AEB에 기초됨)에서 검출하고, 그리고 마지막 10개의 C 말단 아미노산을 갖지 않는 FGF21의 개열된 (CL) 형태를 0.6 pg/ml의 웰내 민감도에서 검출하였다. 활성 (A) FGF21 QSA는 무손상 FGF21을 1.8 pg/ml의 웰내 민감도에서 검출하였다. 전통적인 ELISA와 비교하여, 총 FGF21 및 활성 FGF21 QSAs 둘 모두에서 검정 민감도에서 유의미한 향상이 관찰되었다. 도 20은 총 및 활성 FGF21 검정에 대한 표준 곡선 성과의 대표를 도시한다. 우수한 표준 곡선 성과가 관찰되었다.

[0608] **실시예 7: Quanterix Simoa를 이용한 FGF21 검출 검정의 최적화**

[0609] 실시예 6에서 설명된 FGF21 QSAs는 이들 검정의 민감도를 향상시키기 위해 더욱 최적화되었다.

[0610] 이들 검정의 민감도에 대한 검정 회석제의 유형의 효과가 분석되었다. 2가지 상이한 회석제, BA010 회석제 (PBS, 0.5% BSA, 0.25% CHAPS, 5mM EDTA, 0.35M NaCl, 0.05% Tween-20, 0.05% 프로클린 300, pH 7.4) 및 IL-12 회석제 (PBS, 1.5% BSA, 0.15% Tween-20, 0.05% 프로클린 300, pH 7.4)가 검사되었다. BA010 회석제는 총 및 활성 FGF21 검정 둘 모두에 대해 잘 작동하고, 그리고 더욱 낮은 배경 및 향상된 민감도를 유발하였다 (도 21).

[0611] 상기 검정의 민감도에 대한 상자성 비드의 농도의 효과가 또한 분석되었다. 2가지 상이한 농도, 1.22×10^7 비드/ml의 "높은" 비드 농도 및 0.59×10^7 비드/ml의 "낮은" 비드 농도가 검사되었다. 도 22에서 도시된 바와 같이, 총 FGF21 검정의 경우에 높은 비드 농도 및 낮은 비드 농도 사이에서 유사한 검정 민감도 관찰되었다. 하지만, 활성 FGF21 검정의 경우에 낮은 비드 농도에서 향상된 민감도가 관찰되었다 (도 22). 특히, 활성 FGF21 검정은 낮은 비드 농도에서 관찰된 0.6 pg/ml의 웰내 민감도와 비교하여, 높은 비드 농도가 이용될 때 1.2 pg/ml의 웰내 민감도를 가졌다. 3개의 상이한 상자성 비드 로트 역시 분석되었다. 도 23에서 도시된 바와 같이, 포획 상자성 비드의 현재 로트 및 새로운 로트에서 유사한 결합 곡선 및 검정 민감도가 관찰되었다. 최적화된 검정 파라미터는 표 14에서 도시된다.

[0612] 표 14. 최적화된 검정 파라미터.

표 14

시약	농도
검정 회석제 (BA010)	1X
비드	0.59×10^7 비드/ml
검출 항체 (총, 활성)	0.8 μ g/mL, 2.2 μ g/mL
SBG	310pM

[0614] 상이한 검출 항체가 총 FGF21 검정을 위해 검사되었다. 항체 mAb11, mAb15 및 C-ter pAb가 검사되었다. 총 FGF21 검정에서 다양한 검출 항체에서 유사한 민감도가 관찰되었다 (도 24). 하지만, mAb15에 대한 곡선이 가장 낮은 배경을 가졌다.

[0615] 도 14, 19 및 22에서 도시된 결과로부터, 총 및 활성 FGF21 검정을 위한 검출 항체 및 SBG의 최적화된 농도가 결정되었다 (표 15). 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정 둘 모두에 대한 검정 민감도는 검출 항체 및 SBG의 농도가 증가될 때 향상되었다. 총 FGF21 검정의 민감도는 0.8 μ g/mL의 검출 항체 농도 및 310 pM의 SBG 농도에서 향상되었고, 그리고 활성 FGF21 검정의 민감도는 2.2 μ g/mL의 검출 항체 농도 및 310 pM의 SBG 농도에서 향상되었다.

[0616] 표 15. 검출 항체 농도 및 SBG의 최적화.

표 15

총 FGF21 검정 민감도 (pg/ml)		
검출 항체 (μ g/mL)	SBG (pM)	
	310	155
0.8	0.1	0.4
0.4	0.7	0.3
활성 FGF21 검정 민감도 (pg/ml)		

검출 항체 ($\mu\text{g/mL}$)	SBG (pM)	
	310	155
2.2	0.5	1.1
1.1	2.2	1.4

[0618] 후크 효과가 관찰되는 지를 결정하기 위해, 총 FGF21 검정이 더욱 분석되었다. 후크 효과는 전형적으로, 많은 양의 피분석물이 표본 내 존재하고, 그리고 관찰된 값이 부정하게 더욱 낮을 때 관찰된다. 이들 검정은 하기와 같이 수행되었다: 총 검정의 경우에, 포획이 0.59×10^7 비드/ml의 농도에서 mAb4 접합된 상자성 비드를 이용하여 수행되었고, 그리고 검출이 $0.8 \mu\text{g/mL}$ 의 비오틴화된 mAb15를 이용하여 수행되었다; 활성 검정의 경우에, 포획이 0.59×10^7 비드/ml의 농도에서 mAb4 접합된 상자성 비드를 이용하여 수행되었고, 그리고 검출이 $2.2 \mu\text{g/mL}$ 비오틴화된 양 항-FGF21 C 말단 pAb를 이용하여 수행되었다. 도 25에서 도시된 바와 같이, 총 FGF21 검정에서 어떤 후크 효과도 관찰되지 않았다. 게다가, 총 FGF21 검정은 유사한 민감도에서 무손상 인간 FGF21 및 FAP-개열된 인간 FGF21 (CL hFGF21)을 검출하였다 (도 25).

[0619] **실시예 8: FGF21 QSA를 이용한 혈장 표본의 분석**

[0620] 총 및 활성 FGF21 QSAs가 건강한 인간 공여자로부터 획득되고 막 준비된 표본을 분석하는 데 이용되었다. 이들 검정은 실시예 6에서 설명된 바와 같이 수행되었다. 도 26에서 도시된 바와 같이, 상기 검정은 건강한 공여자의 혈청 표본에서 낮은 수준의 활성 FGF21을 검출할 수 있었다. 고혈압성이거나 또는 어떤 약물 치료도 받지 않은 공여자에서 추가 실험이 수행되었고, 그리고 MS-SAFE, 단백질분해효소 저해제 각테일의 이용과 비교되었다 (도 27). 2형 당뇨병 환자에서 추가 실험이 수행되었다. 도 28a-b에서 도시된 바와 같이, 14개의 표본 중에서 모든 표본 (100%)에서 FGF21이 총 FGF21 검정을 이용하여 검출되었다. 활성 FGF21 검정의 경우에, FGF21 단백질이 12/14 표본 (86%)에서 검출되었다 (도 28a-b). 이들 검정으로부터 획득된 결과는 재현가능하였다 (도 29). 재현성은 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정 둘 모두에서 $\pm 30\%$ 차이 내에서 허용가능하였다.

[0621] 회석 선형성이 총 및 활성 FGF21 검정에 대해 분석되었다. 회석 선형성은 총 FGF21의 경우 최소 요구 회석 (MRD) (1:20 회석)으로부터 및 활성 FGF21 검정의 경우 1:40 회석에서 $\pm 30\%$ 변화 내에서 허용가능하였다 (도 30). 초기 MRD에서 더욱 높은 농도의 추세가 관찰되었다. 총 및 활성 FGF21 검정에 대한 LLOQ가 결정되었다. 예비적 LLOQ는 가장 높은 회석 인자에서 평균 계산된 농도의 $\pm 30\%$ 내에서 허용가능 회복에 기초하여, 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에 대해, 각각 3.15 pg/mL 및 10.94 pg/mL 인 것으로 결정되었다 (도 31).

[0622] 이들 검정의 특이성이 더욱 분석되었다. 도 32에서 도시된 바와 같이, 특이성은 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에서 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 mAb4의 존재에서 6개의 2형 당뇨병성 혈장 표본 모두의 AEB 값의 90% 이상 저해에 의해 증명되었다.

[0623] 프로테아제, 에스테라아제 및 DPP-IV 저해제의 조합을 포함하고 항응고성 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 를 포함하는 P800 혈액 수집 시스템의 이용이 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 단독의 이용과 비교되었다 (도 33). P800 및 K_2EDTA 스크린 혈장 표본 사이에 허용가능 $\pm 30\%$ 차이 내에서 필적하는 결과가 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에서 관찰되었다 (도 34). P800 및 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 스크린 혈장 표본 사이에 우수한 상관성이 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에서 관찰되었다 (도 35-36). $2-8^\circ\text{C}$ 에서 보관된 후, 혈장 표본의 안정성이 분석되었다. 도 37에서 도시된 바와 같이, $2-8^\circ\text{C}$ 안정성 표본으로부터 허용가능 $\pm 30\%$ 회복 내에서 표본 안정성이 총 FGF21 및 활성 FGF21 검정에서 관찰되었다.

[0624] 도 38 및 39에서 도시된 바와 같이, 총 및 활성 FGF21 검정에 의해 분석된 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 스크린 혈장 표본에서 100% 보다 높은 활성 비율이 관찰되었는데, 이것은 비특이성 항체에 의한 간섭을 암시하였다. 특히, 검정 회석제가 단독으로 이용될 때, GC29819 연구로부터 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 스크린 혈장 표본 16 및 17로부터 100%보다 높은 활성 비율이 관찰되지만 표본 9 및 10에서는 그렇지 않았다. 100%보다 높은 활성 비율을 갖는 표본 16 및 17은 인간 항생취 항체 (HAMA) 및 인간 항양 항체 (HASA)를 내포하였는데, 이것은 환자 혈장 표본에서 HAMA 및 HASA의 존재가 총 및 활성 검정의 정확도를 간섭한다는 것을 지시하였다. 도 38 및 39에서 도시된 바와 같이, HAMA는 총 및 활성 검정 둘 모두에 영향을 주었고; 반면, HASA는 활성 검정에만 영향을 주었다. 총 검정의 회석제에 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 생쥐 IgG의 첨가 및 활성 검정의 회석제에 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 양 IgG의 첨가는 각각, HAMA 및 HASA 간섭을 효과적으로 제거하였고, 그리고 관찰되는 100%보다 높은 활성 비율을 해결하였다 (도 38 및 39). 도 40에서 도시된 바와 같이, 검정 회석제에서 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 항생취 IgG 또는 항양 IgG의 존재는 각각, 총 및 활성 검정의 표준 곡선에 영

향을 주지 않았다.

실시예 9: 키메라 항-FGF21 항체

K149C 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 프레임워크 위에 항체 mAb4, mAb9, mAb11 및 mAb15가 합체되어, 생쥐 VH와 VL 영역 및 K149C 돌연변이를 갖는 인간 불변 영역을 포함하는 생쥐/인간 키메라 항-FGF21 항체가 산출되었다. 이들 키메라 항체에 대한 아미노산 서열은 아래의 표 16-19, 그리고 도 41a 및 41b에서 제공된다.

표 16

표 16

키메라 Ab4 (FGF21.GN36.4.hIgG1; PRO418189)
<u>전장 경쇄 아미노산 서열</u> QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCHQYH RSPPTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWCDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 63)
<u>전장 중쇄 아미노산 서열</u> EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISTGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRSEDAM YYCARHDLVDWYFDVWGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 67)
<u>경쇄 가변 영역</u> QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCHQYH RSPPTWTFGGGKVEIK (서열 번호: 71)
<u>중쇄 가변 영역</u> EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISTGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRSEDAM YYCARHDLVDWYFDVWGTTVTSS (서열 번호: 75)

표 17

표 17

키메라 Ab9 (FGF21.GN36.9.hIgG1; PRO418190)
<u>전장 경쇄 아미노산 서열</u> DIQMTQSPASLSASVGETVITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVNIRTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYD SPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWCDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 62)
<u>전장 중쇄 아미노산 서열</u> EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAV YYCTRGGYGGALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 66)
<u>경쇄 가변 영역</u> DIQMTQSPASLSASVGETVITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVNIRTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYD SPWTFGGGKVEIK (서열 번호: 70)
<u>중쇄 가변 영역</u> EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAV YYCTRGGYGGALDYWGQGTSTVTVSS (서열 번호: 74)

표 18

표 18

키메라 Ab11 (FGF21.GN36.11.hIgG1; PRO418191)
<u>전장 경쇄 아미노산 서열</u> QIVLTQSPALMSASPGERVMTCTASGSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTNSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQWSSN PRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWCDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 61)

전장 중쇄 아미노산 서열
QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEITYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YFCTRSDYGFDDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 65)
경쇄 가변 영역
ALMSASPGERVMTCSAGSSVSIMYQYQKPRSSPKPIYLTNSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPRTFGGGT KVEIK (서열 번호: 69)
중쇄 가변 영역
QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEITYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YFCTRSDYGFDDYWGQGTTLTVSS (서열 번호: 73)

[0633] 표 19

표 19

키메라 Ab15 (FGF21.GN36.15.hIgG1; PR0418192)
전장 경쇄 아미노산 서열
DVLMQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQIIVHNNGDYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTSYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 60)
전장 중쇄 아미노산 서열
QVQLIQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTGYYAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKS GNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSVFFKMNSLQADDTAIY YCARNGYDYEFVYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 64)
경쇄 가변 영역
DVLMQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQIIVHNNGDYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPYTFGGGTKVEIK (서열 번호: 68)
중쇄 가변 영역
QVQLIQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTGYYAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKS GNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSVFFKMNSLQADDTAIY YCARNGYDYEFVYWGQGTTLTVSS (서열 번호: 72)

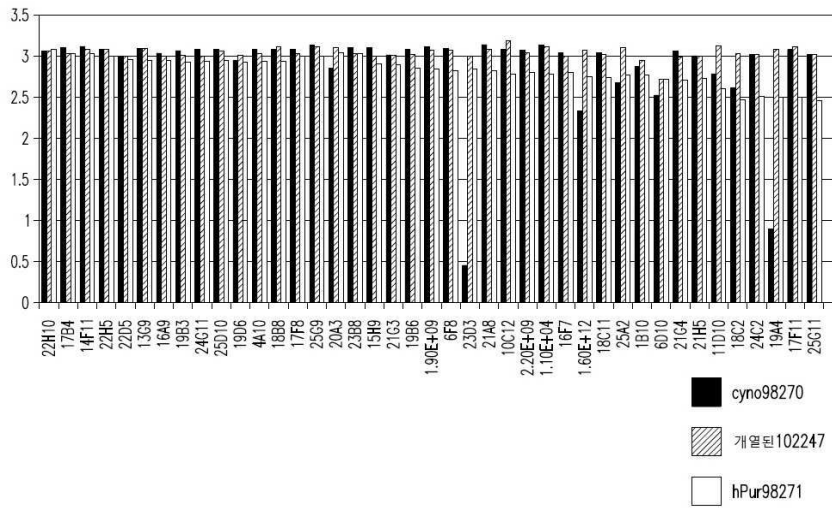
[0635] 묘사되고 청구된 다양한 구체예에 더하여, 개시된 요부는 본원에서 개시되고 청구된 특질의 다른 조합을 갖는 다른 구체예에 또한 관계한다. 따라서, 본원에서 제시된 특정 특질은 개시된 요부가 본원에서 개시된 특질의 임의의 적합한 조합을 포함하도록, 개시된 요부의 범위 내에서 다른 방식으로 서로 조합될 수 있다. 개시된 요부의 특정한 구체예에 관한 전술한 설명은 예시 및 설명의 목적으로 제시되었다. 이것은 완전하거나 또는 개시된 요부를 개시된 구체예로만 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0636] 다양한 변형과 변이가 개시된 요부의 사상 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서, 개시된 요부의 조성물과 방법에서 만들어질 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 개시된 요부는 첨부된 청구항의 범위 안에 있는 변형과 변이 및 이들의 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

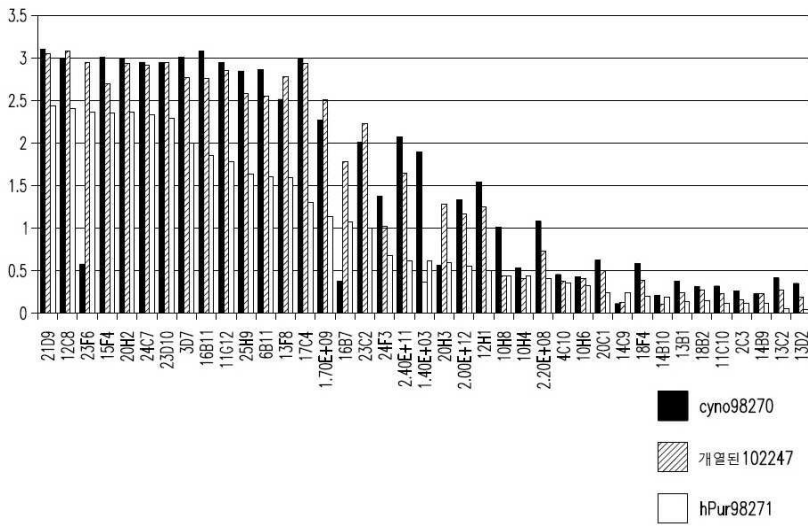
[0637] 다양한 간행물, 특허 및 특허 출원이 본원에서 인용되는데, 이들의 내용은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

도면

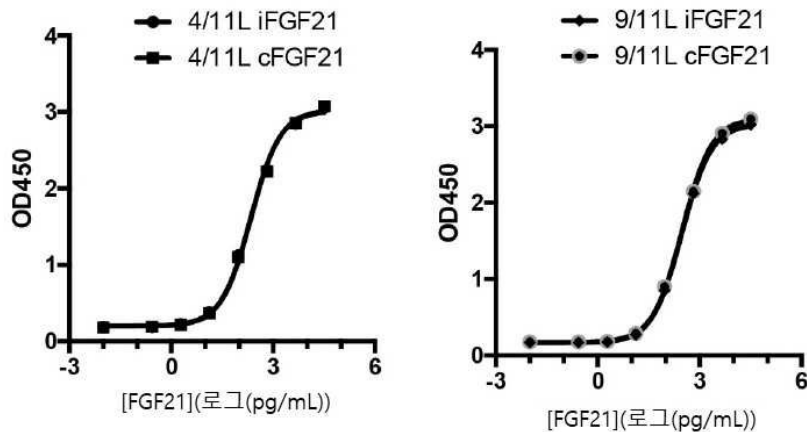
도면1a



도면1b



도면2



iFGF21: 무손상 FGF21

cFGF21: 개질된 FGF21

도면3

파일: 항-FGF21 Hyb 실제 실행

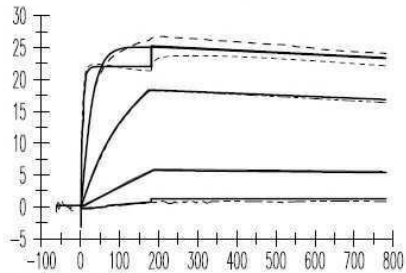
항목: FGF214

리간드: Hyb 4

표본: FGF21

곡선: Fc=2-1

온도: 25°C



모형: 1:1 결합

ka (1/Ms): 3.816E+5 KD (M): 3.689E-10
kd (1/s): 1.408E-4



파일: 항-FGF21 Hyb 실제 실행

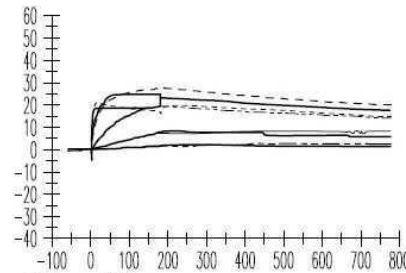
항목: FGF216

리간드: Hyb 9

표본: FGF21

곡선: Fc=4-1

온도: 25°C



모형: 1:1 결합

ka (1/Ms): 5.813E+5 KD (M): 8.895E-10
kd (1/s): 5.171E-4



파일: 항-FGF21 Hyb 실제 실행

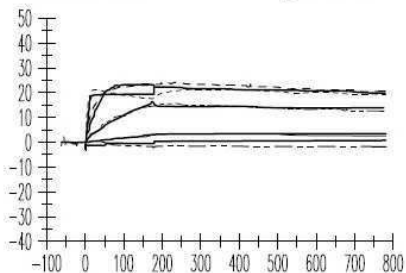
항목: FGF213

리간드: Hyb 11

표본: FGF21

곡선: Fc=4-1

온도: 25°C



모형: 1:1 결합

ka (1/Ms): 7.075E+5 KD (M): 2.704E-10
kd (1/s): 1.913E-4



파일: 항-FGF21 Hyb 실제 실행

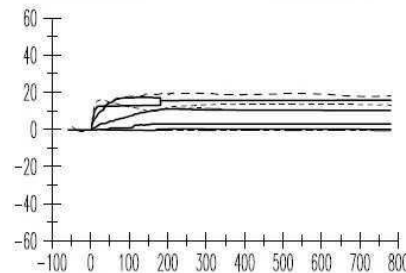
항목: FGF219

리간드: Hyb 15

표본: FGF21

곡선: Fc=4-1

온도: 25°C

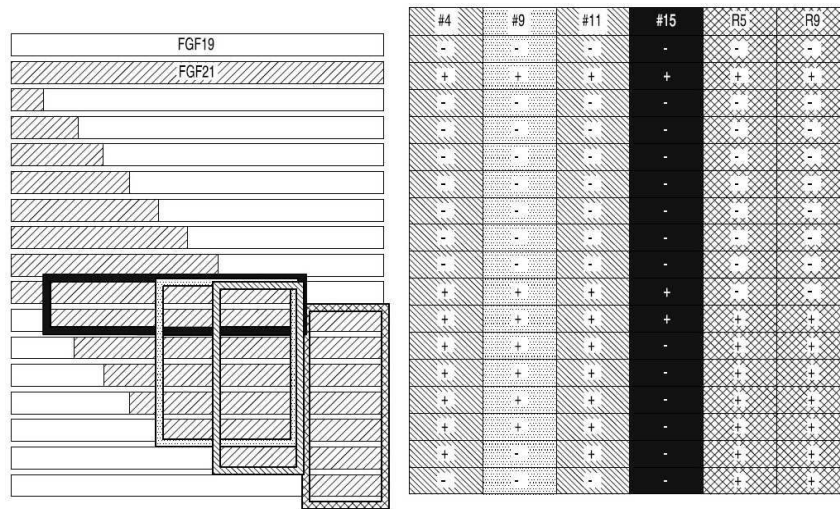


모형: 1:1 결합

ka (1/Ms): 6.216E+5 KD (M): 3.955E-12
kd (1/s): 2.459E-6

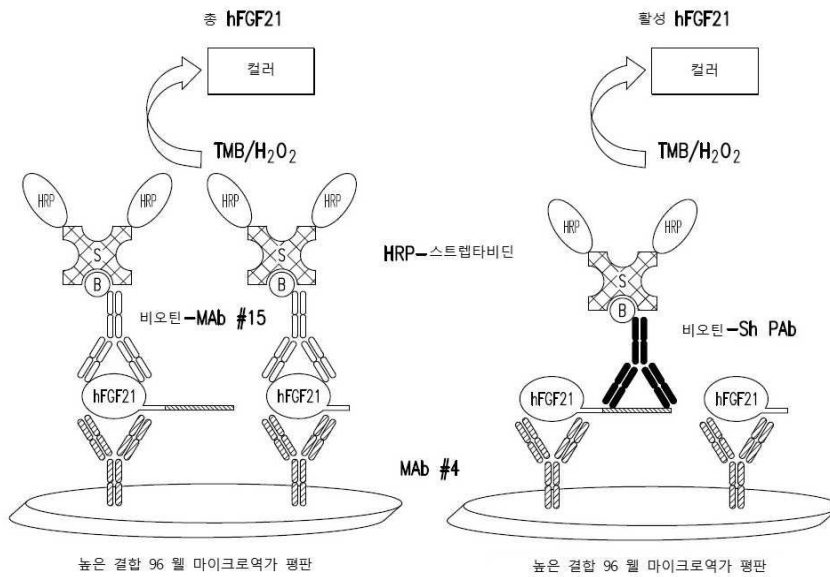


도면4



+: 결합 신호, -: 결합 신호 없음

도면5



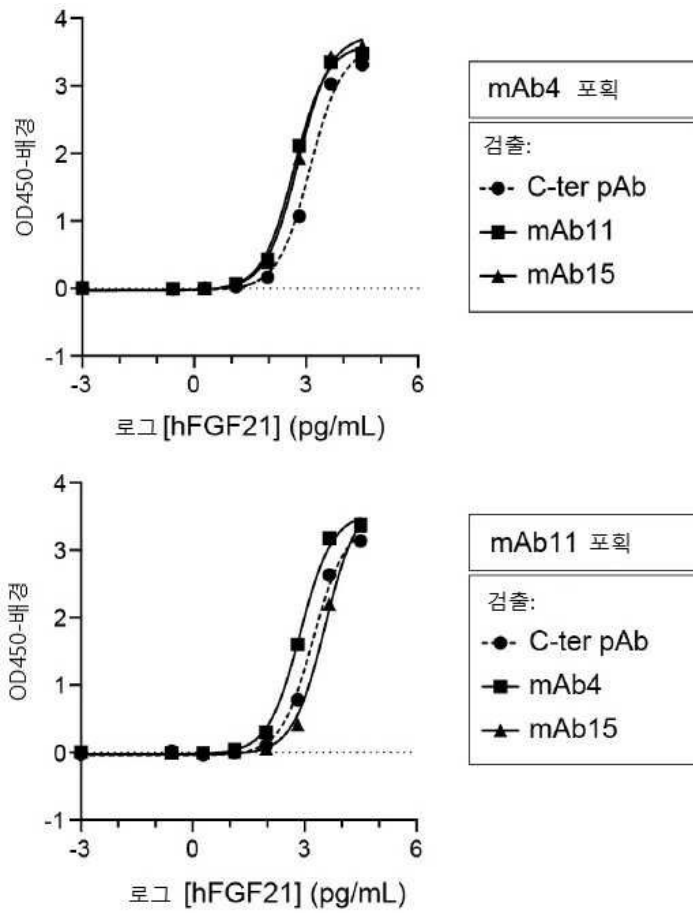
도면6

- 1 2-8°C에서 하룻밤 동안, 코팅 완충액에서 웰당 100 μ L의 0.5 μ g/ml의 코트 항체로 마이크로역가 평판을 코팅한다.
- 2 평판을 주기마다 웰당 400 μ L의 세척 완충액으로 3회 세척한다.
- 3 웰당 200 μ L의 차단 완충액을 평판에 추가하고, 그리고 평판을 실온에서 진탕하면서 1-3 시간 동안 항온처리한다.
(유의: 만약 코팅된 마이크로역가 평판이 동결되었다면, 송풍기가 켜진 후드에서 실온에서 1-3 시간 동안 평판을 항온처리한다).
- 4 하기 실례와 같이 표준 (Std) 곡선을 준비한다:
1590 μ g/mL의 농도에서 야생형 (WT) hFGF21 표준 공급원
중간 용액 2를 실례로서 아래의 표에서 설명된 바와 같이 제조한다:

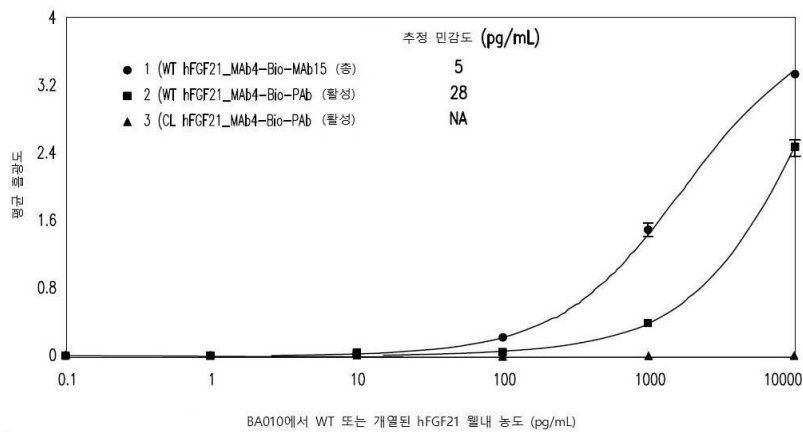
스톡	농도 (pg/mL)	공급원 농도(pg/mL)	배수 희석	공급원의 체적 (μ L)	표준 희석제의 체적 (μ L)	총 체적 (μ L)
중간물 1	10000000	1590000000	159	3.1	496.9	500
중간물 2	100000	10000000	100	5.0	495.0	500

- | 표준 농도 (pg/mL) | 절차 |
|------------------|---|
| Std1 4000 | 100000 pg/mL에서 40 μ L의 중간물 2 + 960 μ L 표준 희석제 |
| Std2 1000 | 250 μ L std1 + 750 μ L 표준 희석제 |
| Std3 250 | 250 μ L std2 + 750 μ L 표준 희석제 |
| Std4 625 | 250 μ L std3 + 750 μ L 표준 희석제 |
| Std5 15.625 | 250 μ L std4 + 750 μ L 표준 희석제 |
| Std6 3.906 | 250 μ L std5 + 750 μ L 표준 희석제 |
| Std7 0.977 | 250 μ L std6 + 750 μ L 표준 희석제 |
| Std8 NA | NA |
| 음성 대조 (NC) 0.000 | 750 μ L 표준 희석제 |
- 5 대조 (QC) 및 표본을 검정 희석제에서 X (TBD) 희석에서 희석한다.
 - 6 평판을 주기마다 웰당 400 μ L의 세척 완충액으로 3회 세척한다.
 - 7 희석된 표준/대조/표본을 웰당 100 μ L씩 이중으로 평판에 추가한다.
 - 8 평판을 실온에서 진탕하면서 2 시간 동안 항온처리한다.
 - 9 비오틴화된 검출 항체를 검정 희석제에서 0.5 μ L/mL로 희석한다.
 - 10 평판을 주기마다 웰당 400 μ L의 세척 완충액으로 3회 세척한다.
 - 11 웰당 100 μ L의 희석된 비오틴화된 검출 항체를 평판에 추가한다.
 - 12 평판을 실온에서 진탕하면서 1 시간 동안 항온처리한다.
 - 13 HRP 접합체 스톡 공급원을 HRP-접합체 희석제에서 1:500 희석 (TBD)으로 희석한다.
 - 14 평판을 주기마다 웰당 400 μ L의 세척 완충액으로 3회 세척한다.
 - 15 웰당 100 μ L의 희석된 HRP-접합체를 평판에 추가한다.
 - 16 평판을 실온에서 진탕하면서 1 시간 동안 항온처리한다.
 - 17 평판을 주기마다 웰당 400 μ L의 세척 완충액으로 4회 세척한다.
 - 18 웰당 100 μ L의 TMB 기질을 평판에 추가한다.
 - 19 평판을 실온에서 진탕하면서 대략 15-20 분 동안 항온처리한다.
 - 20 웰당 100 μ L의 1 M 인산을 평판에 추가한다.
 - 21 450 nm 판독 파장 및 630 nm 또는 650 nm 참조 파장을 이용하여 평판을 판독한다.

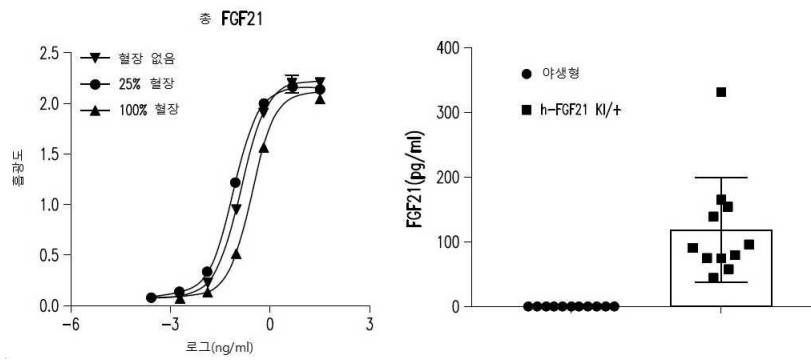
도면7



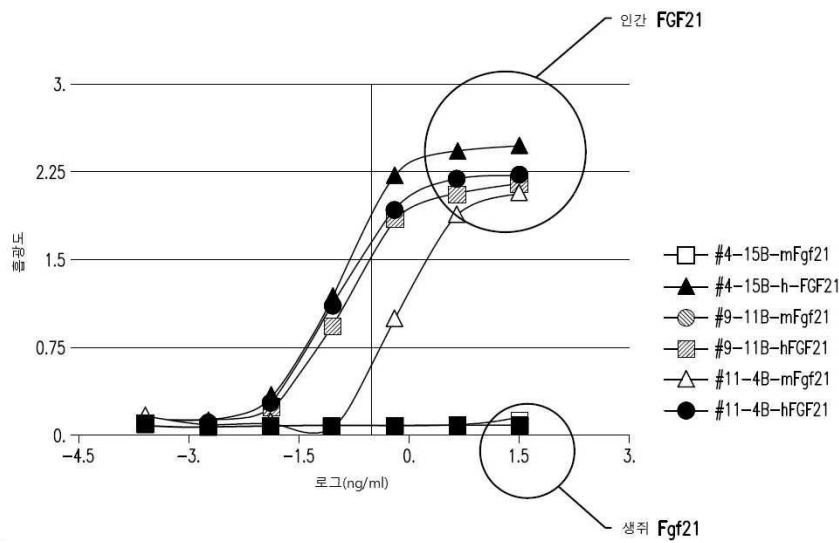
도면8



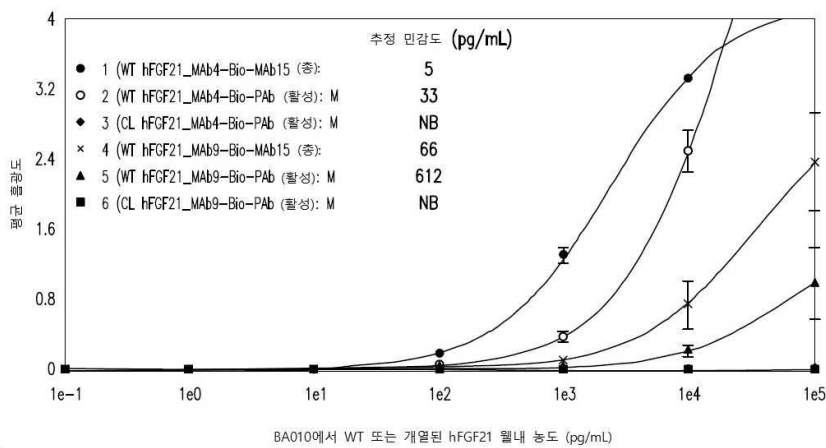
도면9



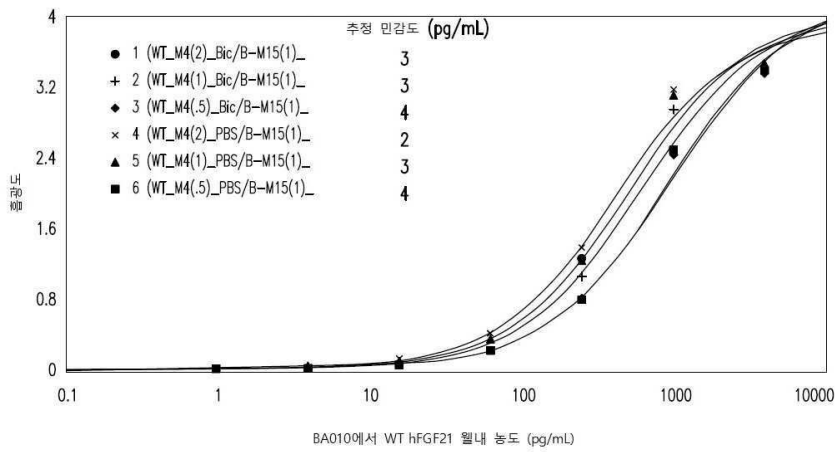
도면10



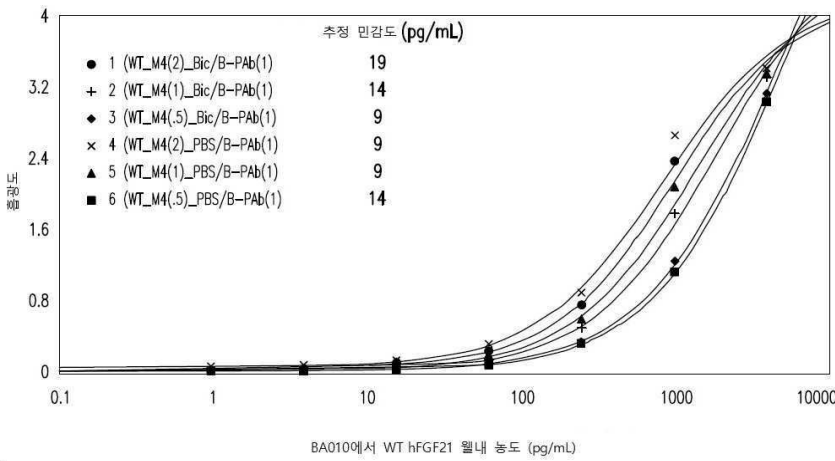
도면11



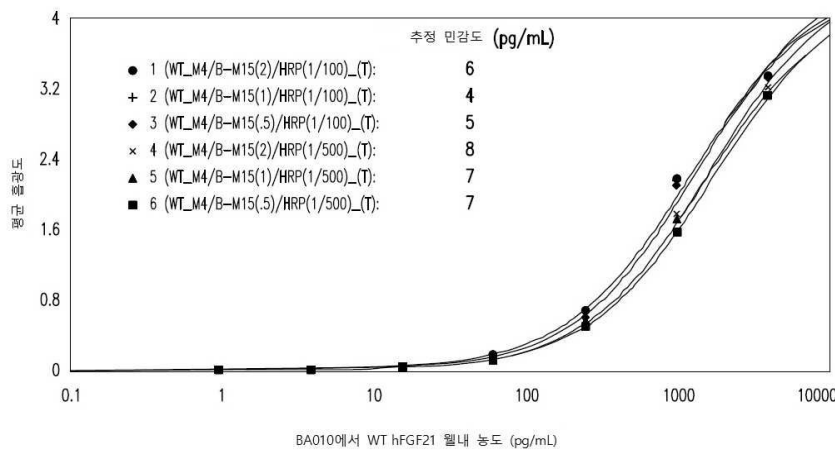
도면12



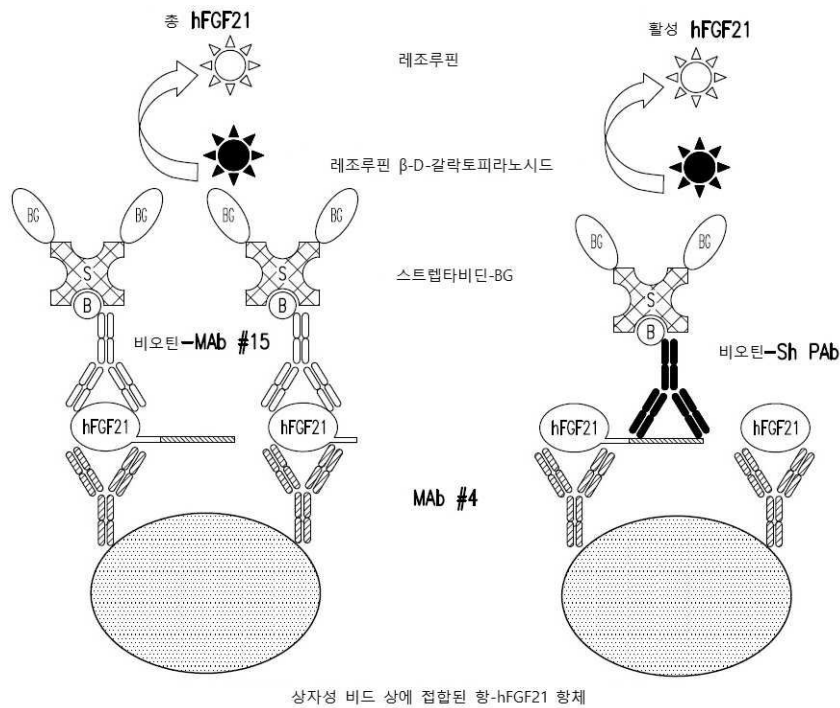
도면13



도면14



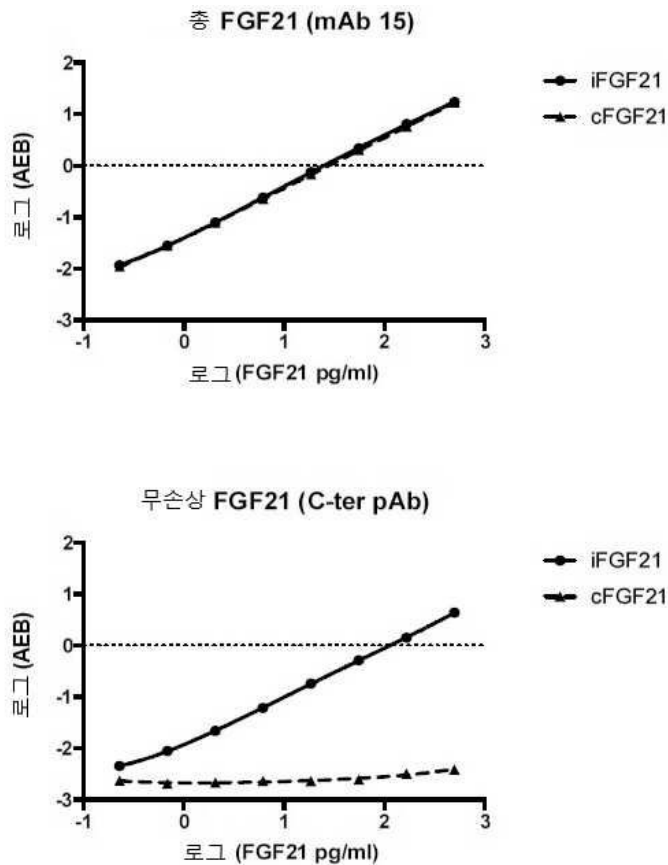
도면15



도면16

단계	값	단위	최소	최대	유의
1 단계					
비드	홀브루 1 비드				
액체 체적	25	μL	10	185	
표본/검정기					
액체 체적	100	μL	10	172	
검출기	홀브루 1 검출				
액체 체적	20	μL	10	185	
항온처리 시간	80	카덴스 (45s)	1	1120	60:00 분
2 단계					
SBG	홀브루 1 SBG				
액체 체적	100	μL	10	185	
항온처리 시간	7	카덴스 (45s)	1	1120	5:15 분
계측					

도면17



iFGF21:무손상FGF21

cFGF21: 개열된 FGF21

도면18

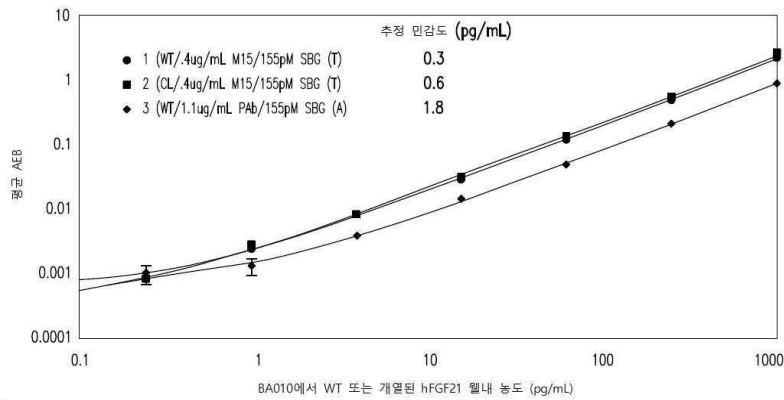
- 15 mL 또는 50 mL 폴리프로필렌 원심분리기 튜브에서 항-hFGF21 MAb #4 코팅된 상자성 비드, 비오틴-접합체 및 SBG의 작업 용액을 제조한다.
- 각 작업 용액을 개별 Quanterix 검정 시약 병으로 이전한다.
- 하기 실례와 같이 표준 (Std) 곡선을 준비한다:
10 µg/mL의 농도에서 야생형 (WT) hFGF21 표준 스톡.
중간 용액 2를 실례로서 아래의 표에서 설명된 바와 같이 제조한다:

스톡	농도 (pg/mL)	공급원 농도 (pg/mL)	배수 희석	공급원의 체적 (µL)	표준 희석제의 체적 (µL)	총 체적 (µL)
중간물 1	100000	10000000	100	20.0	1980.0	2000
중간물 2	1000	100000	100	20.0	1980.0	2000

표준 농도 (pg/mL)	절차
Std1 400	1000 pg/mL에서 400µL의 중간물 2 + 600µL 표준 희석제
Std2 100	250 µL std1 + 750 µL 표준 희석제
Std3 25	250 µL std2 + 750 µL 표준 희석제
Std4 6.3	250 µL std3 + 750 µL 표준 희석제
Std5 1.5625	250 µL std4 + 750 µL 표준 희석제
Std6 0.391	250 µL std5 + 750 µL 표준 희석제
Std7 0.098	250 µL std6 + 750 µL 표준 희석제
Std8 0.024	250 µL std6 + 750 µL 표준 희석제
음성 대조 (NC) 0.000	750 µL 표준 희석제

- 순수한 높은 대조와 낮은 대조 (QC)를 이용하고, 그리고 내인성 대조 (EC) 또는 표본을 검정 희석제에서 1:20 최소 요구 희석 (M RD) 및 차후 희석에서 희석한다.
- 희석된 표준/대조/표본을 증복을 위해 충분한 웰당 300 µL로 평판에 추가한다.
- 완전히 자동화된 Quanterix Simoa HD-1 기기를 설치하고 실험을 수행한다.

도면19



도면20

WT hFGF21 농도 (pg/mL)

평균 AEB

표준 편차

CV%

S/N 비율

평균 결과

회수 %

1000

2.1119

0.0924

4.4

4036

1055

105

250

0.4766

0.0029

0.6

911

245

98

62.50

0.1130

0.0028

2.5

216

59

95

15.63

0.0289

0.0004

1.4

55

15

98

3.91

0.0080

0.0008

9.7

15

4

105

0.98

0.0024

0.0003

12

4

1.0

102

0.24

0.0010

0.0003

26

2

0.2

97

블랭크

0.0005

0.0001

11

1

범위 ?

CL hFGF21 농도 (pg/mL)

평균 AEB

표준 편차

CV%

S/N 비율

평균 결과

회수 %

1000

2.5205

0.0523

2.1

3183

1126

113

250

0.5253

0.0014

0.3

663

240

96

62.50

0.1266

0.0005

0.4

160

59

95

15.63

0.0309

0.0007

2.2

39

15

93

3.91

0.0082

0.0003

3.1

10

4

98

0.98

0.0029

0.0001

3.5

4

1.3

129

0.24

0.0008

0.0002

20

1

0.2

91

블랭크

0.0008

0.0001

15

1

0.2

WT hFGF21 농도 (pg/mL)

평균 AEB

표준 편차

CV%

S/N 비율

평균 결과

회수 %

1000

0.8592

0.0113

1.3

1085

1008

101

250

0.2030

0.0011

0.5

256

244

98

62.50

0.0492

0.0019

3.9

62

60

96

15.63

0.0142

0.0003

2.4

18

17

110

3.91

0.0039

0.0004

11

5

4

106

0.98

0.0013

0.0004

28

2

0.8

78

0.24

0.0010

0.0003

27

1

0.3

142

블랭크

0.0010

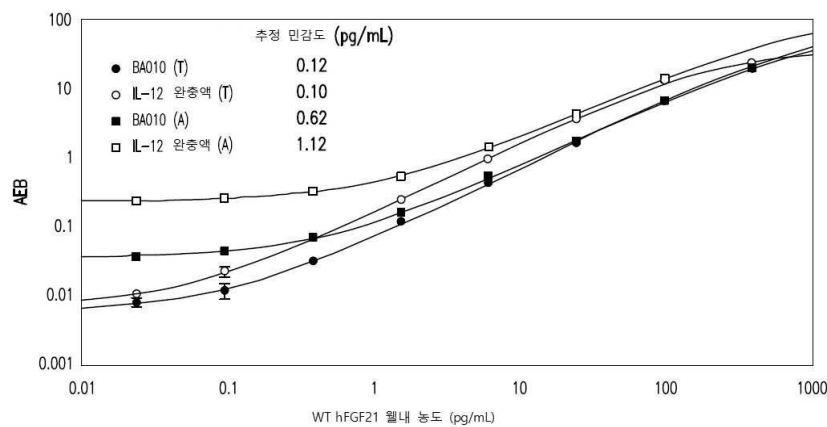
0.0002

16

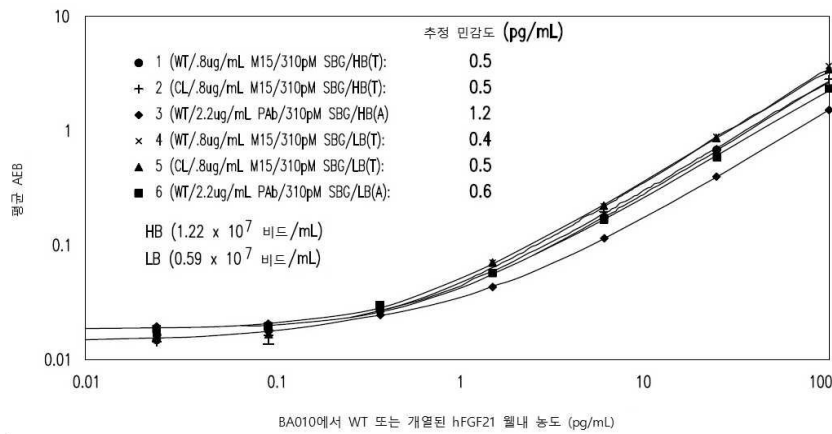
1

0.4

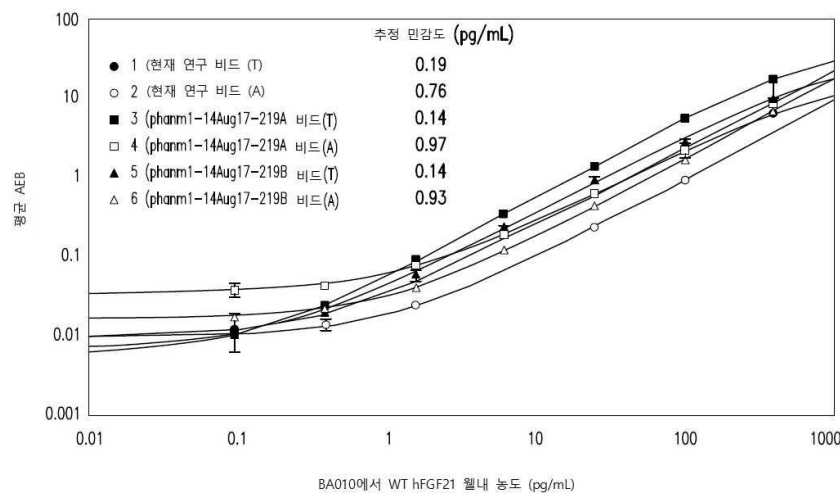
도면21



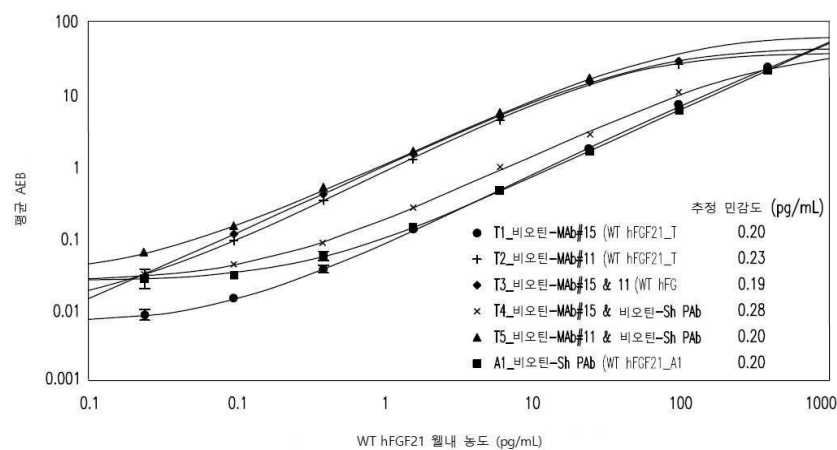
도면22



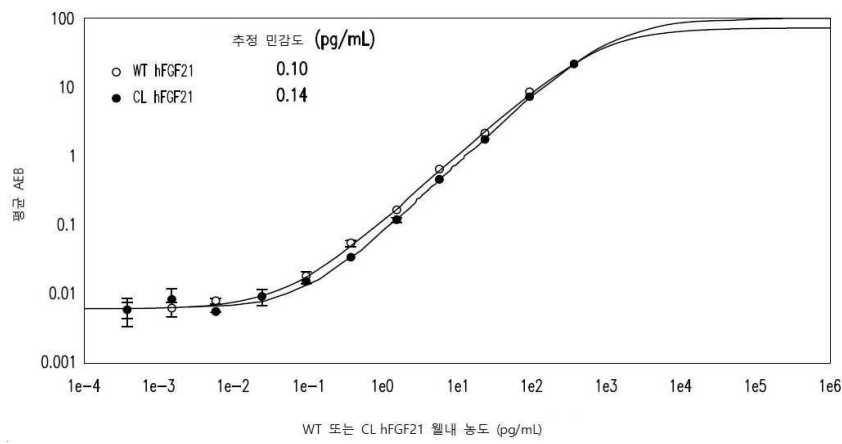
도면23



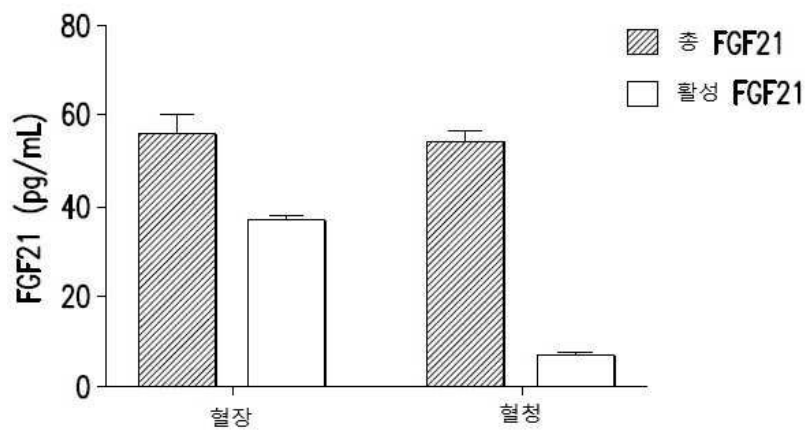
도면24



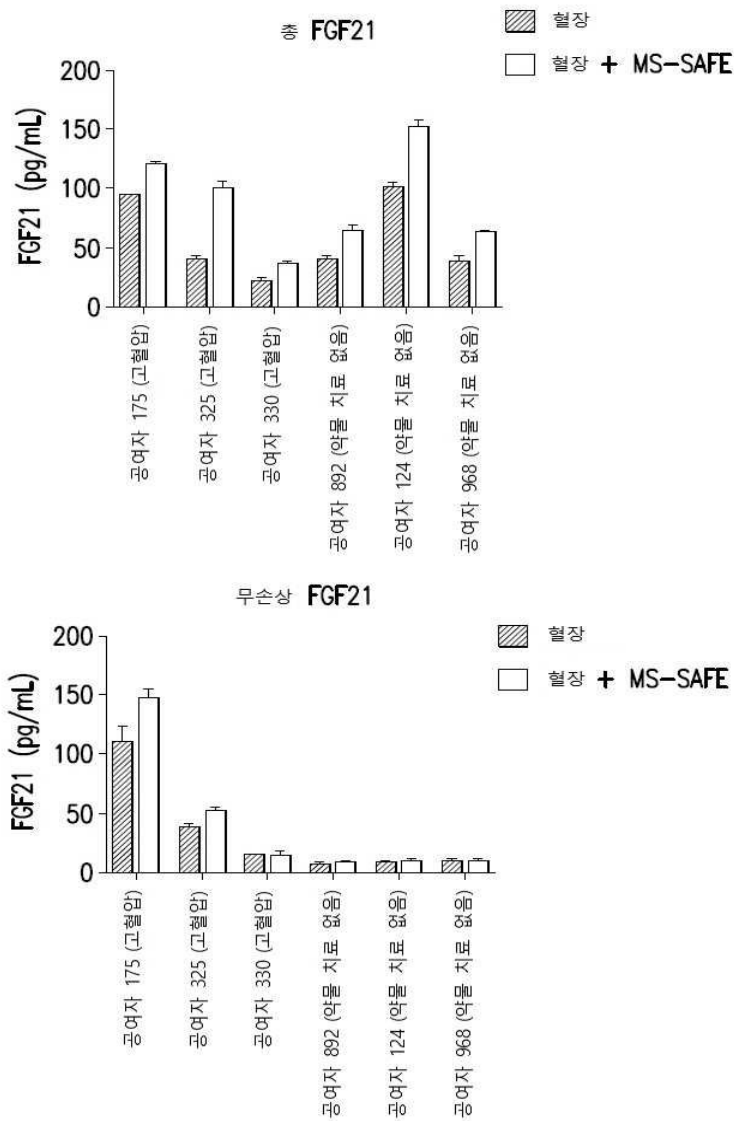
도면25



도면26



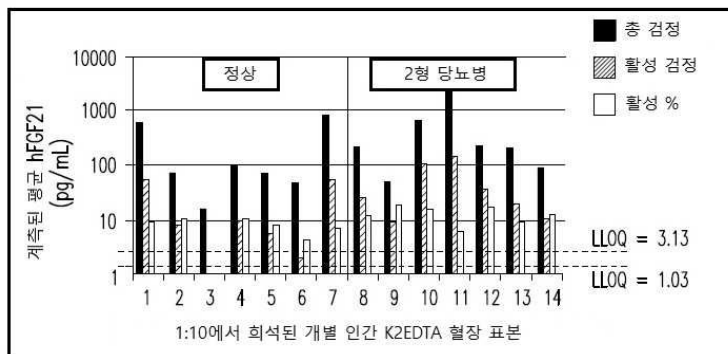
도면27



도면28a

총 및 활성 hFGF21 검정에서 검출감도 (1 일자)

	K ₂ EDTA 혈장 표본	총 검정	활성 검정	활성 %
정상	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
2형 당뇨병	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12

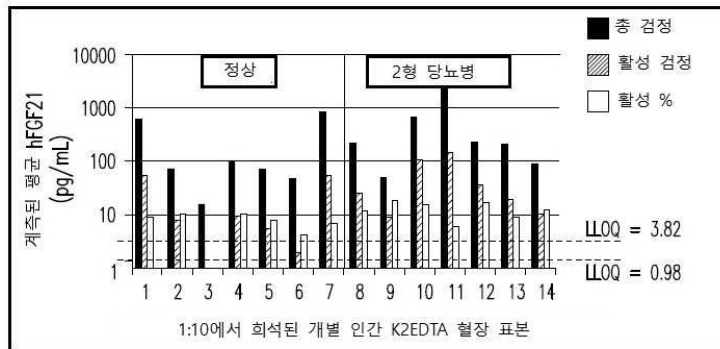


- 검출감도는 총 검정에서 14/14 (100%) 및 활성 검정에서 12/14 (86%)이다.

도면28b

총 및 활성 hFGF21 검정에서 검출감도 (2 일자)

	K ₂ EDTA 혈장 표본	총 검정	활성 검정	활성 %
정상	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
2형 당뇨병	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12



• 검출감도는 총 검정에서 14/14 (100%) 및 활성 검정에서 12/14 (86%)이다.

도면29

	K ₂ EDTA 혈장 표본	총 검정 (pg/ml)			활성 검정 (pg/ml)		
		1 일자	2 일자	차이 %	1 일자	2 일자	차이 %
정상	1	596	345	-42	56	51	-9
	2	75	82	9	8	10	25
	3	17	19	12	0	0	NA
	4	96	93	-3	10	10	0
	5	73	75	3	6	6	0
	6	47	52	11	2	2	0
	7	841	787	-6	60	73	22
2형 당뇨병	8	210	255	21	25	30	20
	9	49	57	16	9	11	22
	10	635	620	-2	102	124	22
	11	2389	2163	-9	144	171	19
	12	216	251	16	36	45	25
	13	207	202	-2	19	24	26
	14	85	89	5	10	13	30

도면30

	K ₂ EDTA 혈장 표본	희석	총 검정			활성 검정		
			hFGF21 (pg/mL)	MRD로 부터 회수 %	MRD로 부터 변화 %	hFGF21 (pg/mL)	MRD로 부터 회수 %	MRD로 부터 변화 %
표시된 값	1	20	112	100	0	27	100	0
		40	110	98	-2	23	86	-14
		80	102	91	-9	16	58	-42
		160	96	86	-14	LTR	NA	NA
		320	98	88	-12	LTR	NA	NA
		640	108	97	-3	LTR	NA	NA
		1280	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	2	20	185	100	0	37	100	0
		40	171	92	-8	34	92	-8
		80	163	88	-12	24	65	-35
		160	157	85	-15	23	63	-37
		320	158	85	-15	LTR	NA	NA
		640	171	92	-8	LTR	NA	NA
		1280	152	82	-18	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	3	20	215	100	0	49	100	0
		40	194	90	-10	42	86	-14
		80	193	90	-10	35	70	-30
		160	186	86	-14	22	45	-55
		320	197	92	-8	LTR	NA	NA
		640	183	85	-15	LTR	NA	NA
		1280	217	101	1	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	4	20	133	100	0	13	100	0
		40	143	108	8	13	96	-4
		80	132	100	0	LTR	NA	NA
		160	125	94	-6	LTR	NA	NA
		320	106	80	-20	LTR	NA	NA
		640	111	84	-16	LTR	NA	NA
		1280	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA

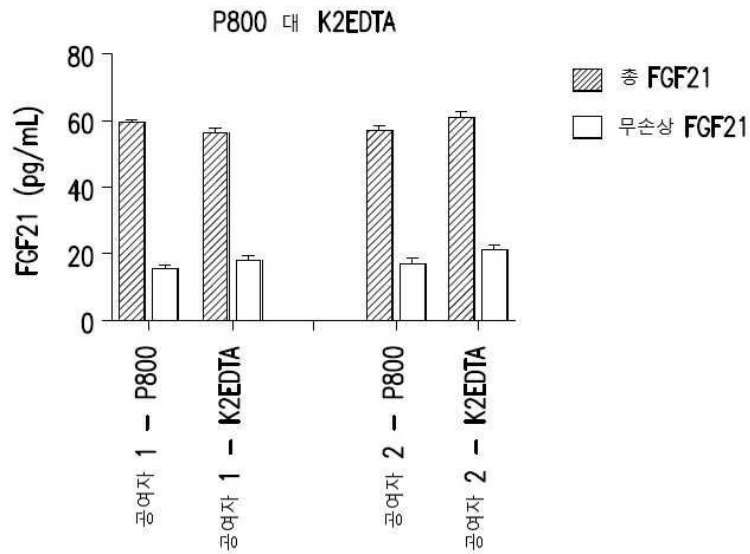
도면31

			총 검정			활성 검정		
	K ₂ EDTA 혈장 표본	희석	hFGF21 (pg/mL)	MRD로 부터 회수 %	LLOQ (pg/mL)	hFGF21 (pg/mL)	MRD로 부터 회수 %	LLOQ (pg/mL)
포도당 내성 시험	1	20	112	100		27	100	
		40	110	98		23	86	0.583
		80	102	91		16	58	
		160	96	86		LTR	NA	
		320	98	88		LTR	NA	
		640	108	97	0.169	LTR	NA	
		1280	LTR	NA		LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	2	20	185	100		37	100	
		40	171	92		34	92	0.851
		80	163	88		24	65	
		160	157	85		23	63	
		320	158	85		LTR	NA	
		640	171	92		LTR	NA	
		1280	152	89	0.119	LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	3	20	215	100		49	100	
		40	194	90		42	86	
		80	193	90		35	70	0.432
		160	186	86		22	45	
		320	197	92		LTR	NA	
		640	183	85		LTR	NA	
		1280	217	112	1.069	LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	4	20	133	100		13	100	
		40	143	108		13	96	0.321
		80	132	100		LTR	NA	
		160	125	94		LTR	NA	
		320	106	80		LTR	NA	
		640	111	84	0.173	LTR	NA	
		1280	LTR	NA		LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
			평균	0.158		평균	0.547	
			SD	0.026		SD	0.230	
			%CV	16.5		%CV	42.0	
1:20 희석에 대해 교정된 최종 LLOQ:					3.15	10.94		

도면32

2형 당뇨병성 K ₂ EDTA 혈장 표본	희석	총 검정					활성 검정				
		표본 단독		표본 + 10 µg/mL Mab #4		저해 % (AEB)	표본 단독		표본 + 10 µg/mL Mab #4		저해 % (AEB)
		평균 AEB	hFGF21 (pg/mL)	평균 AEB	hFGF21 (pg/mL)		평균 AEB	hFGF21 (pg/mL)	평균 AEB	hFGF21 (pg/mL)	
1	20	1.90	565	0.051	9	97	0.32	71	0.020	LTR	94
2	20	4.02	1321	0.015	LTR	100	1.07	284	0.015	LTR	99
3	20	12.03	4730	0.034	5	100	1.44	394	0.023	LTR	98
4	20	1.84	546	0.022	3	99	0.47	110	0.022	LTR	95
5	20	1.52	439	0.011	LTR	99	0.29	62	0.020	LTR	93
6	20	0.82	220	0.004	LTR	99	0.17	31	0.016	LTR	91

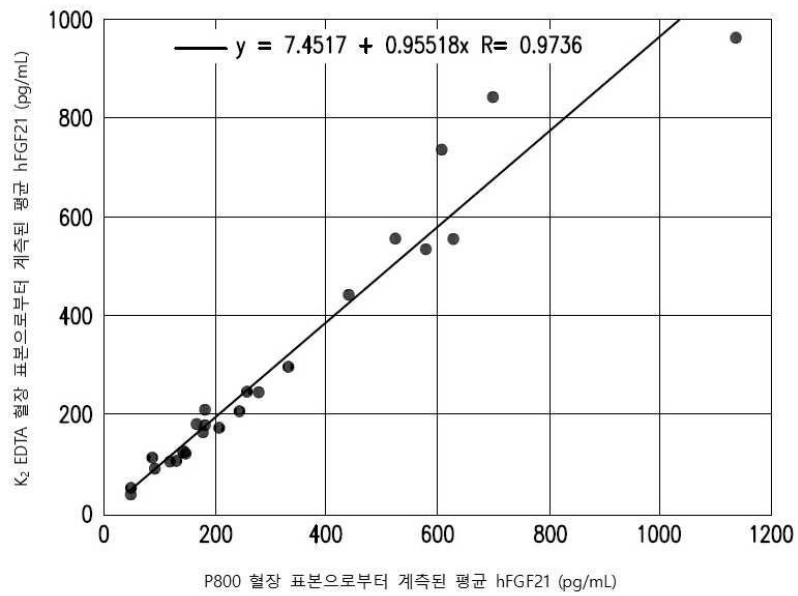
도면33



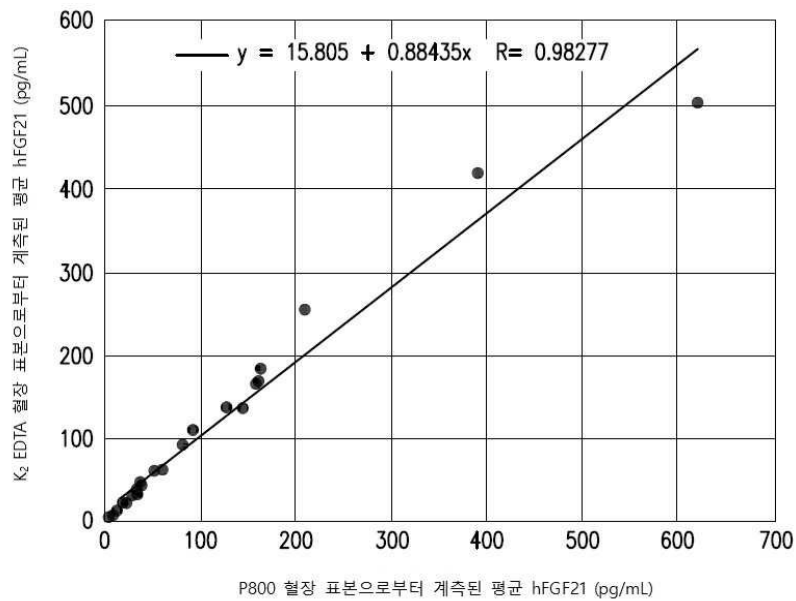
도면34

		총 검정 (pg/ml)			활성 검정 (pg/ml)		
혈장 표본		P800	K ₂ EDTA	차이 %	P800	K ₂ EDTA	차이 %
GC29819 연구 혈자 스크린 표본	1	91	117	29	11	12	4
	2	607	735	21	145	138	-5
	3	169	184	9	35	34	-4
	4	49	57	16	LTR	LTR	NA
	5	LTR	99	NA	LTR	13	NA
	6	185	212	15	39	43	11
	7	699	840	20	158	166	5
	8	179	167	-7	39	49	27
	9	1137	959	-16	209	255	22
	10	628	557	-11	162	170	5
	11	334	298	-11	164	183	11
	12	122	108	-12	20	23	16
	13	147	128	-13	22	25	15
	14	181	179	-1.2	30	35	16
	15	279	248	-11	61	64	5
	16	132	109	-17	391	418	7
	17	259	249	-4	622	502	-19
	18	442	444	0.3	82	93	13
	19	579	536	-7	127	138	9
	20	148	125	-15	20	24	17
	21	49	47	-5	5	7	51
	22	247	209	-15	53	62	17
	23	211	177	-16	35	41	16
	24	524	557	6	93	110	18
	25	95	94	-2	15	16	8
평균		312	297		110	109	
SD		263	257		143	127	
%CV		84	86		129	117	

도면35



도면36

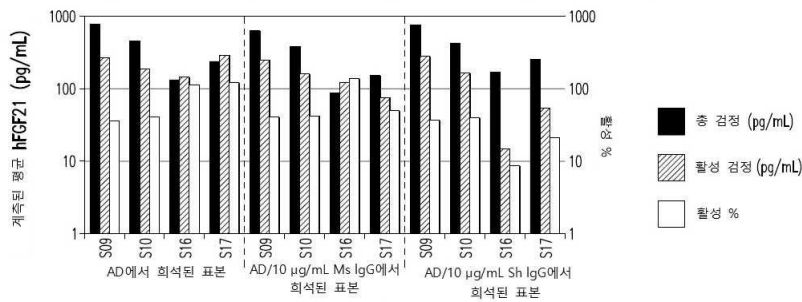


도면37

	개체 #	P800 혈장 안정성 표본	총 검정	2-8°C로부터 회수 %	활성 검정	2-8°C로부터 회수 %	활성 %
GC29819 면역글로불린 표본	AD에서 1 ng/mL WT hFGF21	2-8°C	1064	100	885	100	83
		1X F/T	1000	94	853	96	85
		2X F/T	1016	95	837	95	82
		3X F/T	1009	95	843	95	84
	20008	2-8°C	425	100	80	100	19
		1X F/T	418	98	96	120	23
		2X F/T	422	99	94	118	22
		3X F/T	427	101	97	122	23
	20027	2-8°C	135	100	29	100	22
		1X F/T	121	90	24	82	20
		2X F/T	118	87	24	82	20
		3X F/T	120	89	23	79	19
	20024	2-8°C	480	100	107	100	22
		1X F/T	452	94	103	96	23
		2X F/T	425	89	96	90	23
		3X F/T	451	94	102	95	23
	20029	2-8°C	122	100	28	100	23
		1X F/T	106	87	24	86	22
		2X F/T	113	92	23	83	20
		3X F/T	104	85	22	81	21
	20036	2-8°C	218	100	86	100	39
		1X F/T	199	91	66	77	33
		2X F/T	191	88	63	73	33
		3X F/T	193	88	66	77	34

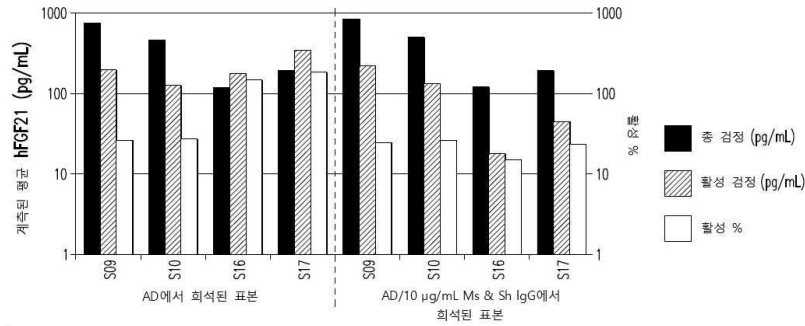
도면38

표본 회색제	GC29819 K ₂ EDTA 표본	총 검정 (pg/mL)	활성 검정 (pg/mL)	활성 %
검정 회색제	S09	764	268	35
	S10	446	182	41
	S16	130	145	112
	S17	238	290	122
검정 회색제/10 µg/mL MslgG	S09	629	254	40
	S10	378	162	43
	S16	88	121	138
	S17	151	75	49
검정 회색제/10 µg/mL ShlgG	S09	755	277	37
	S10	420	167	40
	S16	170	15	9
	S17	254	54	21

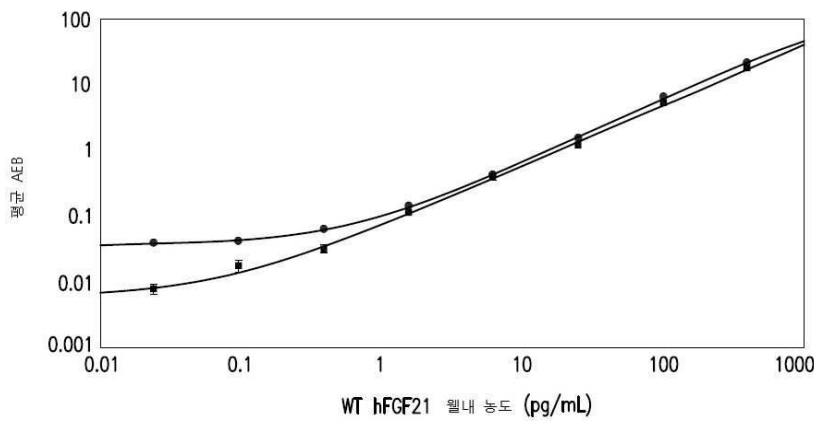


도면39

표본 회석제	GC29819 K ₂ EDTA 표본	총 검정 (pg/mL)	활성 검정 (pg/mL)	활성 %
검정 회석제	S09	738	190	26
	S10	461	122	27
	S16	118	173	146
	S17	191	347	182
검정 회석제 /10 μg/mL Ms & Sh IgG	S09	848	209	25
	S10	501	131	26
	S16	119	18	15
	S17	190	44	23



도면40



도면41a

Kabat 정의에 따른 CDR 서열은 밑줄 표시된다

경쇄 가변 영역

Kabat 번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
FGF21.GN36.4	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	P	L	G	E	R	V	T	M	T	C	T	A	S	S	S	.	.	.	.	.	V	S	S	S	Y	L	H	W	Y	Q
FGF21.GN36.9	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	A	S	V	G	E	T	V	I	I	T	C	R	A	S	E	.	.	.	.	.	N	I	Y	S	Y	L	A	W	Y	Q	
FGF21.GN36.11	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	L	M	S	A	S	P	G	E	R	V	T	M	T	C	S	A	G	.	.	.	.	.	.	S	S	V	S	Y	M	Y	W	Y	Q	
FGF21.GN36.15	D	V	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	I	I	V	H	N	N	G	D	T	Y	L	E	W	Y	L	

CDR L1-점측

CDR L1-Chothia

CDR L1-Kabat

CDR L2-점측

CDR L2-Chothia

CDR L2-Kabat

Kabat 번호	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.4	Q	K	P	G	S	S	P	K	V	W	I	Y	R	T	N	L	A	S	G	V	P	T	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	.
FGF21.GN36.9	Q	K	Q	G	K	S	P	Q	L	L	V	Y	N	I	R	T	L	A	E	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	F	S	L	K	I	N	S	L	Q
FGF21.GN36.11	Q	K	P	R	S	S	P	K	P	W	I	Y	L	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E
FGF21.GN36.15	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	K	I	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	
FGF21.GN36.4	Q	K	P	G	S	S	P	K	V	W	I	Y	R	T	N	L	A	S	G	V	P	T	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	
FGF21.GN36.9	Q	K	Q	G	K	S	P	Q	L	L	V	Y	N	I	R	T	L	A	E	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	F	S	L	K	I	N	S	L	Q
FGF21.GN36.11	Q	K	P	R	S	S	P	K	P	W	I	Y	L	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E
FGF21.GN36.15	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	K	I	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	

도면41aa

	CDR L3-접속										CDR L3-Chothia										CDR L3-Kabat									
Kabat 번호	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107		
FGF21.GN36.4.	A	E	D	A	T	Y	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	P	T	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	
FGF21.GN36.9	P	E	D	F	G	S	Y	Y	C	Q	H	Y	D	S	P	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	
FGF21.GN36.11	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	N	P	.	.	R	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
FGF21.GN36.15	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
FGF21.GN36.4	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	P	T	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K
FGF21.GN36.9	P	E	D	F	G	S	Y	Y	C	Q	H	Y	D	S	P	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	
FGF21.GN36.11	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	N	P	.	.	R	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K
FGF21.GN36.15	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K

도면41b

	중쇄 가변 영역																																										CDR H1-접속										CDR H1-Chothia										CDR H1-Kabat									
Kabat 번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42																														
FGF21.GN36.4.	E	V	K	L	V	E	S	G	G	D	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D																														
FGF21.GN36.9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	P	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	G	W	V	K	Q	S	H	G																														
FGF21.GN36.11	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	I	S	W	V	K	Q	R	T	G																														
FGF21.GN36.15	Q	V	Q	L	I	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	S	P	G																														
																																											CDR H2-접속										CDR H2-Chothia										CDR H2-Kabat									
Kabat 번호	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a																															
FGF21.GN36.4.	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	T	G	G	G	Y	T	Y	P	D	S	V	K	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S																																
FGF21.GN36.9	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	P	N	G	G	Y	T	I	N	N	Q	N	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	T	A	Y	M	E	L	R																															
FGF21.GN36.11	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	Y	P	R	S	D	N	T	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	A	Y	M	E	L	R																																
FGF21.GN36.15	K	G	L	E	W	L	G	M	I	W	.	K	S	G	N	T	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	S	I	T	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K	M																															
FGF21.GN36.4.	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	T	G	G	G	Y	T	Y	P	D	S	V	K	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S																																
FGF21.GN36.9	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	P	N	G	G	Y	T	I	N	N	Q	N	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	T	A	Y	M	E	L	R																															
FGF21.GN36.11	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	Y	P	R	S	D	N	T	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	A	Y	M	E	L	R																																
FGF21.GN36.15	K	G	L	E	W	L	G	M	I	W	.	K	S	G	N	T	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	S	T	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K	M																																

도면41ba

	CDR H3-접속										CDR H3-Chothia										CDR H3-Kabat															
Kabat 번호	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
FGF21.GN36.4.	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	H	D	L	V	D	W	Y	F	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.9	S	L	A	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	Y	G	G	A	L	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	T	R	S	D	Y	G	F	F	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
FGF21.GN36.15	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	G	Y	D	Y	E	F	.	.	V	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
FGF21.GN36.4	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	H	D	L	V	D	W	Y	F	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.9	S	L	A	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	Y	G	G	A	L	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	T	R	S	D	Y	G	F	F	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
FGF21.GN36.15	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	G	Y	D	Y	E	F	.	.	V	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

<120> METHODS FOR DETECTING AND QUANTIFYING FGF21

<130> 00B206.0809

<150> 62/652,701

<151> 2018-04-04

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 2

<211> 194

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu

85 90 95

Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr

100 105 110

Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln

115 120 125

Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu

130 135 140

Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His

145 150 155 160

Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp

165 170 175

Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe

180 185 190

Glu Lys

<210> 3

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro His Val His Tyr Gly Trp Gly Asp

1 5 10 15

Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser

20 25 30

Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg

35 40 45

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

50 55 60

Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly

65 70 75 80

Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys

85 90 95

Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser

100 105 110

Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln

115 120 125

Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met

130 135 140

Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu

145 150 155 160

Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe

165 170 175

Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180 185 190

<210> 4

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser
35 40 45

Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala
50 55 60

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly
65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu
85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His
100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys
115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met
130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met
145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val
165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
180 185

<210> 5

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 5

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala

50 55 60

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly

65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His

100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys

115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met

130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met

145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val

165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180 185

<210> 6

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala

50 55 60

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly

65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His

100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys

115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met

130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met

145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val

165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180 185

<210> 7

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly

65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His

100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys

115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met

130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met

145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val

165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180 185

<210> 8

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly
65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu
85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His
100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys
115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met
130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met
145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val
165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
180 185

<210> 9

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 9

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly

65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His

100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys

115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met

130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met

145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val

165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180 185

<210> 10

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro

130 135 140

Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser

145 150 155 160

Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly

165 170 175

Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180 185

<210> 11

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

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

1 5 10 15

Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro

65 70 75 80

Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser

85 90 95

Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu

100 105 110

Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg

115 120 125

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

130 135 140

Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro

145 150 155 160

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly

165 170 175

Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 12

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly

35 40 45

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys

50 55 60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys

65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

85 90 95

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

100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser

115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu

130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro

165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185

<210> 13

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15
Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30
Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Thr Val Gly Gly

35 40 45
Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys

50 55 60
Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys

65 70 75 80
Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

85 90 95
Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr

100 105 110
Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser

115 120 125
Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu

130 135 140
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

145 150 155 160
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro

165 170 175
Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185

<210> 14

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 14

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys

65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

85 90 95

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

100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser

115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu

130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro

165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185

<210> 15

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys

35 40 45

Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys

50 55 60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys

65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

85 90 95

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

100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser

115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu

130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro

165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185

<210> 16

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

85 90 95

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

100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser

115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu

130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro

165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185

<210> 17

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp

1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly

20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu

85 90 95

Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr

100 105 110

Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln

115 120 125

Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu

130 135 140

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185

<210> 18

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Val Trp

35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro

85 90 95

Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

130 135 140

Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn

145 150 155 160

Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

165 170 175

Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His

180 185 190

Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile

195 200 205

Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210 215

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

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

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 20

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 20

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro

100 105 110
Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser

165 170 175
Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 21

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 22

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
245 250 255

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
260 265 270

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
275 280 285

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
290 295 300

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu

305 310 315 320
Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
 340 345 350
Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
 355 360 365
Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
 370 375 380
Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
 405 410 415
Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
 420 425 430
Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 435 440 445
Lys

<210> 23

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 23

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

 Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
 180 185 190

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

 Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 260 265 270
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
340 345 350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
370 375 380

Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 24

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

 Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

 Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

 Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
 245 250 255
 Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 260 265 270
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln

275 280 285
 Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
 340 345 350
 Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
 355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
 370 375 380
 Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
 405 410 415
 Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 25

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

Gln Val Gln Leu Ile Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr

20					25					30						
Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	
35					40					45						
Gly	Met	Ile	Trp	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Met	
50					55					60						
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	
65					70					75					80	
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
85					90					95						
Arg	Asn	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
100					105					110						
Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	
115					120					125						
Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	
130					135					140						
Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	
145					150					155					160	
Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
165					170					175						
Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	
180					185					190						
Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	
195					200					205						
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	
210					215					220						
Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
225					230					235					240	
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	
245					250					255						
Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	
260					265					270						

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
340 345 350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
370 375 380

Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 26

Ser Tyr Gly Met Ser

1

5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 27

Asp Tyr Tyr Met Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

Asn Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

Gly Tyr Ala Ile His

1 5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 31

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 32

Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

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

1 5 10 15

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

Gly Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Tyr

1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 36

Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

Asn Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Val Tyr

1 5

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 38

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 39

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 40

Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 16

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 42

Arg Thr Thr Asn Leu Ala Ser

1 5

<210>

43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 43

Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 44

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 46
 His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Trp Thr
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 47
 Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 48
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

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

<400> 49

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Val Trp

35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro

85 90 95

Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 52

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr
85 90 95

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

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 53

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 54

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

85 90 95
Thr Arg Gly Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 56

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 56

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 57

Gln Val Gln Leu Ile Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Ile
Thr	Cys	Thr	Val
Ser	Gly	Phe	Ser
Leu	Thr	Gly	Tyr
20	25	30	
Ala	Ile	His	Trp
Val	Arg	Gln	Ser
Pro	Gly	Lys	Gly
Leu	Glu	Trp	Leu
35	40	45	
Gly	Met	Ile	Trp
Lys	Ser	Gly	Asn
Thr	Asp	Tyr	Asn
Ala	Ala	Phe	Met
50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Ser
Ile	Thr	Lys	Asp
Asn	Ser	Lys	Ser
Gln	Val	Phe	Phe

65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser
Leu	Gln	Ala	Asp
Asp	Thr	Ala	Ile
Tyr	Tyr	Cys	Ala
85	90	95	
Arg	Asn	Gly	Tyr
Asp	Tyr	Glu	Phe
Val	Tyr	Trp	Gly
Gln	Gly	Thr	Leu
100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser
Ala			
115			

<210> 58

<211> 171

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro

165 170

<210> 59

<211> 177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

1 5 10 15

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

20 25 30

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

35 40 45
 Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 50 55 60
 Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 85 90 95

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

 Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 165 170 175
 Ser

<210> 60

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 60

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

35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 61

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 61

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

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

 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 62
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

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

<400> 62

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

1 5 10 15
Glu Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

 20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

 35 40 45
Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp

 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

 100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

 115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

 130 135 140
Lys Val Gln Trp Cys 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> 63

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 63

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Val Trp

35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro

85 90 95

Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

180 185 190

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 64
<211> 447
<212> PRT
<213>
> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 64

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

Gly Met Ile Trp Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asn Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 65

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 65

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

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

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

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 66

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 67

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 67

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

Lys

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 68

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 69

Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser

1 5 10 15

Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg

20 25 30

Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

65 70 75 80

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu

85 90 95

Ile Lys

<210> 70

<211> 107

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 70

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

Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 71

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 71

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

Ile Tyr Arg Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95
 Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 72

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 72

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

Gly Met Ile Trp Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 74

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Gly Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 75

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly

100

105

110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

His Pro Ile Pro

1

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

1

5

10