



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월29일
(11) 등록번호 10-1822663
(24) 등록일자 2018년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7025047
(22) 출원일자(국제) 2010년03월24일
심사청구일자 2015년03월20일
(85) 번역문제출일자 2011년10월24일
(65) 공개번호 10-2011-0129976
(43) 공개일자 2011년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/028470
(87) 국제공개번호 WO 2010/111367
국제공개일자 2010년09월30일
(30) 우선권주장
61/163,222 2009년03월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02002102973 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
애쉬케나지, 아비
미국 94402 캘리포니아주 산 마테오 테리타운 스
트리트 1456
강, 정
미국 94122 캘리포니아주 샌프란시스코 22번 애비
뉴 1543
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 36 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 항-F G F R 3 항체 및 그의 사용 방법

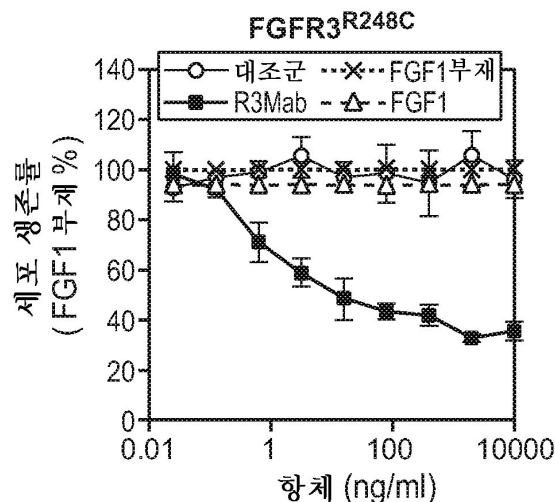
(57) 요약

본 발명은 FGFR3 항체, 및 이들 항체를 포함하는 조성물 및 이들 항체의 사용 방법을 제공한다.

<대표도>

도 9D

대표도



(72) 발명자

와이즈만, 크리스티안

스위스 체하-4103 보트민겐 후크샤그베그 27

유, 얀

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 블라이스 스트리트 1160

명세서

청구범위

청구항 1

(i) (a) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및

(ii) (a) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,

인간 FGFR3에 1×10^{-8} M의 Kd로 또는 이보다 더 강하게 결합하고,

FGFR3 수용체와 수용체의 다른 유닛의 이량체화를 억제하여 수용체의 활성화를 억제하는,

단리된 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, FGFR3-IIIb 및 FGFR3-IIIc에 결합하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 효능제 기능이 없는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 이펙터(effector) 기능을 보유하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 이펙터 기능이 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 포함하는 것인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, t(4;14) 전위를 포함하는 다발성 골수종 세포를 사멸시킬 수 있는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 네이키드(naked) 항체인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 8

제5항에 있어서, 10,000개 이상의 FGFR3 분자를 발현하는 세포를 사멸시킬 수 있는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 아미노산 서열 LAVPAANTVRFRCPA (서열 179) 또는 SDVEFHCKVYSDAQ (서열 180)을 포함하는 폴리펩티드에 결합하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 구성적 FGFR3 활성을 억제하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 구성적 FGFR3 활성이 리간드-의존성 구성적 FGFR3 활성인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 구성적 FGFR3 활성이 리간드-비의존성 구성적 FGFR3 활성인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, FGFR3-IIIb^{R248C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, FGFR3-IIIb^{K652E}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, FGFR3-IIIb^{S249C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 16

제1항에 있어서, FGFR3-IIIb^{G372C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, FGFR3-IIIb^{Y375C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 18

제1항에 있어서, 서열 132를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 19

제1항에 있어서, 서열 133을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 20

제1항에 있어서, 서열 132를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 133을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 21

제1항에 있어서, 프레임워크 서열의 적어도 일부가 인간 컨센서스 프레임워크 서열인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 22

제1항에 있어서, 인간 κ 하위군 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 23

제1항에 있어서, 중쇄 인간 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 24

제1항에 있어서, 모노클로날 항체인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 25

제1항에 있어서, 키메라 항체, 인간화 항체, 친화도 성숙 항체, 인간 항체, 및 이중특이적 항체로 이루어진 군 으로부터 선택되는 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 26

제1항에 있어서, 항체 단편인 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 27

(i) (a) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

(c) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및

(ii) (a) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는,

단리된 모노클로날 항-FGFR3 길항제 항체.

청구항 28

제1항 또는 제27항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 상기 폴리뉴클레오티드가 발현 되도록 배양하는 것, 및 임의로 상기 항체를 배양물로부터 회수하는 것을 포함하는, 항-FGFR3 길항제 항체의 제조 방법.

청구항 29

제1항 또는 제27항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 30

제29항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 31

제1항 또는 제27항의 항-FGFR3 길항제 항체를 포함하는, 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증, 및 두개골유합증 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 골격 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 32

제1항 또는 제27항의 항-FGFR3 길항제 항체를 포함하는, 대상에서 암 세포를 고갈시키기 위한 제약 조성물.

청구항 33

제1항 또는 제27항의 항-FGFR3 길항제 항체를 포함하는, 대상에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 암이 고형암, 다발성 골수종, 방광 암종, 비소세포 폐암, 난소암, 갑상선암, 두경부암, 간암, 유방 암종, 위암, 이행 세포 암종, 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 암이 FGFR3 활성화, FGFR3 과다발현, 또는 FGFR3 활성화 및 FGFR3 과다발현과 관련된 것인 제약 조성물.

청구항 36

제1항 또는 제27항의 항-FGFR3 길항제 항체를 포함하는, 대상에서 다발성 골수종 세포를 고갈시키기 위한 제약 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 2009년 3월 25일에 출원된 미국 특허 출원 제61/163,222호를 우선권 주장하며, 그 내용이 본원에 참고로 도입된다.

[0003] <발명의 분야>

[0004] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-FGFR3 항체, 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 및 이들의 수용체 (FGFR)는 배아 발생, 조직 항상성 및 대사 동안 중요한 역할을 수행한다 (1-3). 인간에서, 22개의 FGF (FGF1-14, FGF16-23) 및 티로신 키나제 도메인을 갖는 4개의 FGF 수용체 (FGFR1-4)가 존재한다. FGFR은 2 또는 3개의 이류노글로볼린-유사 도메인 (IgD1-3)을 갖는 세포외 리간드 결합 영역, 단일-통과 막횡단 영역, 및 세포질, 스플릿 티로신 키나제 도메인으로 이루어진다. FGFR1, 2 및 3은 각각 2개의 주요한 다르게 스플라이싱된 이소형 (IIIb 및 IIIc로 지칭함)을 갖는다. 이들 이소형은 IgD3의 후반부에서 약 50개 아미노산이 상이하고, 독특한 조직 분포 및 리간드 특이성을 갖는다. 일반적으로, IIIb 이소형은 상피 세포에서 발견되는 반면, IIIc는 중간엽 세포에서 발현된다. 헤파란 설페이트 프로테오글리칸과 함께 FGF에 결합하면 FGFR은 이량체화되고, 특정 티로신 잔기에서 인산화된다. 이는 FGFR 기질 2α (FRS2α)와 같은 중요한 어댑터 단백질의 동원을 용이하게 하여, 미토젠-활성화된 단백질 키나제 (MAPK) 및 PI3K-AKT 경로를 포함하는 다중 신호전달 캐스케이드의 활성화를 일으킨다 (1, 3, 4). 따라서, FGF 및 그의 동족 수용체는 배경-의존성 방식으로 증식, 분화, 이동 및 생존을 포함하는 세포 과정의 광범위한 배열을 조절한다.

[0006] 비정상적으로 활성화된 FGFR은 특정 인간 악성종양에 관련된다 (1, 5). 특히, t(4;14) (p16.3;q32) 염색체 전위는 FGFR3의 과다발현을 유발하는 것으로 다발성 골수종 환자의 약 15-20%에서 발생하며, 보다 짧은 전반적인 생존과 관련된다 (6-9). FGFR3은 또한 배양물에서 골수종 세포주에 대한 화학요법내성 부여에 관련되며 (10), 종래의 화학요법에 대한 t(4;14)+ 환자의 좋지 않은 임상 반응과 일치한다 (8). 돌연변이적으로 활성화된 FGFR3의 과다발현은 조혈 세포 및 섬유모세포 (11-14, 15), 트랜스제닉 마우스 모델 (16) 및 무린 골수 이식 모델 (16, 17)에서 종양원성 형질전환을 유도하기에 충분하다. 따라서, FGFR3은 다발성 골수종에서 잠재적 치료 표적으로 제안되었다. 사실상, FGFR을 표적으로 하는 여러 소분자 억제제는, FGFR3에 대해 선택적이지 않고, 다른 특정 키나제를 향한 교차-억제 활성을 가지고 있으나, 배양물 및 마우스 모델에서 FGFR3-양성 골수종 세포에 대해 세포독성을 입증하였다 (18-22).

[0007] 또한 높은 분획의 방광암에서의 FGFR3 과다발현이 문헌에 보고되었다 (23, 24). 또한, FGFR3에서의 체세포 활성화 돌연변이가 유두 암종의 60-70% 및 근육-침습성 방광 암종의 16-20%에서 확인되었다 (24, 25). 세포 배양물 실험에서, RNA 간섭 (11, 26) 또는 FGFR3 단일-쇄 Fv 항체 단편은 방광암 세포 증식을 억제하였다 (27). 최근 연구는 FGFR3 항체-독소 접합체가 종양에서 FGFR3-매개 독소 전달을 통한 방광암 세포주의 이중이식편 성장을 약화시킨다는 것을 입증하였다 (28). 그러나, FGFR3 신호전달이 사실상 방광 종양의 생체내 성장의 종양원성 구동자인지는 아직 확실하지 않다. 또한, 방광암에서 FGFR3 표적화에 대한 치료적 잠재성은 생체내 모델에 기초하여 규정되지 않았다. FGFR3 및 항-FGFR3 항체에 대한 공개문헌은 미국 특허 공개 제2005/0147612호; 문헌 [Rauchenberger et al., J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003)]; WO2006/048877; [Martinez-Torrecuadrada et al., (2008) Mol Cancer Ther 7(4): 862-873]; WO2007/144893; [Trudel et al. (2006) 107(10): 4039-4046]; [Martinez-Torrecuadrada et al. (2005) Clin Cancer Res 11 (17): 6280-6290]; [Gomez-Roman et al. (2005) Clin Cancer Res 11:459-465]; [Direnzo, R et al. (2007) Proceedings of AACR Annual Meeting, Abstract No. 2080]; WO2010/002862를 포함한다.

[0008] 치료제로서의 개발에 최적인 임상 특성이 있는 작용제가 계속 요구된다는 것이 명백하다. 본원에 기재된 발명은 이러한 요구를 충족시키고, 다른 이점을 제공한다.

[0009] 특허 출원 및 공개공보를 포함하여 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참고로 도입된다.

발명의 내용

- [0010] <발명의 개요>
- [0011] 본 발명은 부분적으로 다양한 FGFR3 결합제 (예컨대 항체 및 그의 단편)의 확인에 기초한다. FGFR3은 중요하고 유리한 치료 표적을 제공하고 본 발명은 FGFR3에 대한 작용제의 결합을 기초로 하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 FGFR3 결합제는 본원에 기재된 바와 같이 FGFR3 신호전달 경로의 발현 및/또는 활성과 관련된 병리 상태를 표적화하는데 사용하기 위한 중요한 치료제 및 진단제를 제공한다. 따라서, 본 발명은 FGFR3 결합과 관련된 방법, 조성물, 키트 및 제조품을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 FGFR3에 결합하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 FGFR3에 결합하는 단리된 항체를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 항체는 FGFR3 IIIb 이소형 및/또는 FGFR3 IIIc 이소형에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 돌연변이화된 FGFR3 (예를 들어, FGFR3 IIIb R248C, S249C, G372C, Y375C, K652E 중 하나 이상, 및/또는 FGFR3 IIIc R248C, S249C, G370C, Y373C, K650E 중 하나 이상)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 단량체 FGFR3 (예를 들어, 단량체 FGFR3 IIIb 및/또는 IIIc 이소형)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 예컨대 이량체 FGFR3 형태와 관련하여 단량체 FGFR3 형태를 안정화시킴으로써, 단량체 FGFR3의 형성을 증진시킨다.
- [0013] 한 측면에서, 본 발명은 단리된 항-FGFR3 항체를 제공하며, 여기서 항체의 전장 IgG 형태는 인간 FGFR3에 1×10^{-7} 의 Kd로 또는 이보다 더 강하게 결합한다. 당업계에서 잘 확립된 바와 같이, 그의 수용체에 대한 리간드의 결합 친화도는 임의의 다양한 검정을 이용하여 결정할 수 있고, 다양한 정량적 값으로 표현할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합 친화도는 Kd 값으로 표현되고, (예를 들어, 최소화된 결합력 효과와 함께) 내인성 결합 친화도를 반영한다. 일반적으로 및 바람직하게는, 결합 친화도는 세포-비함유 또는 세포-관련 설정에 관계없이 시험관내에서 측정한다. 본원에 기재된 것을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 다수의 검정을 사용하여 결합 친화도 측정 (예를 들어, 비아코어(Biacore), 방사성면역검정 (RIA) 및 ELISA 포함)을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체의 전장 IgG 형태는 1×10^{-8} 의 Kd로 또는 이보다 더 강하게, 1×10^{-9} 의 Kd로 또는 이보다 더 강하게, 또는 1×10^{-10} 의 Kd로 또는 이보다 더 강하게 인간 FGFR3에 결합한다.
- [0014] 일반적으로, 본 발명의 항-FGFR3 항체는 길항제 항체이다. 따라서, 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3 활성화 (예를 들어, FGFR3-IIIb 및/또는 FGFR3-IIIc 활성화)를 억제한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체 (일반적으로 2가 형태)는 실질적인 FGFR3 효능제 기능을 보유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 길항제 항체 (일반적으로 2가 형태)는 거의 혹은 전혀 FGFR3 효능제 기능을 보유하지 않는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (일반적으로 2가 형태)는 통계학상 유의한 백그라운드 수준보다 높은 FGFR3 효능제 활성 수준을 나타내지 않는다.
- [0015] 한 측면에서, FGFR3에 대한 항체의 결합은 수용체의 또 다른 유닛과 수용체의 이량체화를 억제할 수 있으며, 이에 의해 수용체의 활성화가 억제된다 (적어도 부분적으로는 수용체 이량체화의 결여 때문임). 억제는 직접적이거나 간접적일 수 있다.
- [0016] 한 측면에서, 본 발명은 실질적인 아폽토시스 활성을 보유하지 않는 (예를 들어, 세포, 예를 들어 이행 세포 암종 세포 또는 다발성 골수종 세포, 예컨대 t(4;14) 전위와 같은 FGFR3 전위를 포함하는 다발성 골수종 세포의 아폽토시스를 유도하지 않는) 항-FGFR3 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 거의 또는 전혀 아폽토시스 기능을 보유하지 않는다. 일부 실시양태에서, FGFR3 항체는 통계학상 유의한 백그라운드 수준보다 높은 아폽토시스 기능을 나타내지 않는다.
- [0017] 한 측면에서, 본 발명은 실질적인 FGFR3 하향조절을 유도하지 않는 항-FGFR3 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 거의 또는 전혀 수용체 하향조절을 유도하지 않는다. 일부 실시양태에서, FGFR3 항체는 통계학상 유의한 백그라운드 수준보다 높은 수용체 하향조절을 유도하지 않는다.
- [0018] 한 측면에서, 본 발명은 이펙터 기능을 보유하는 항-FGFR3 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-FGFR3 항체 (일부 실시양태에서, 네 이키드 항-FGFR3 항체)는 세포, 일부 실시양태에서는 다발성 골수종 세포 (예를 들어, 전위, 예를 들어 t(4;14) 전위를 포함하는 다발성 골수종 세포)를 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 세포 당 약 10,000개 이상의 FGFR3 분자 (예컨대 세포 당 약 11,000개, 약 12,000개, 약 13,000개, 약 14,000개, 약 15,000개, 약 16,000개, 약 17,000개, 약 18,000개 이상의 FGFR3 분자)를 발현하는 세포를 사멸시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 세포는 세포 당 약 2000개, 약 3000개, 약 4000개, 약 5000개, 약 6000개, 약 7000개, 약

8000개 이상의 FGFR3 분자를 발현한다.

- [0019] 한 측면에서, 본 발명의 항-FGFR3 항체는 구성적 FGFR3 활성을 억제한다. 일부 실시양태에서, 구성적 FGFR3 활성은 리간드-의존성 FGFR3 구성적 활성이다. 일부 실시양태에서, 구성적 FGFR3 활성은 리간드-비의존성 구성적 FGFR3 활성이다.
- [0020] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{R248C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제한다. 본원에 사용된 용어 "FGFR3-IIIb^{R248C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는"은 FGFR3-IIIb^{R248C} 및 FGFR3-IIIc^{R248C}, 및 FGFR3-IIIb R248에 상응하는 위치에 R → C 돌연변이를 포함하는 추가의 FGFR3 형태를 포함하는 것으로 이해된다. 당업자는 각각의 FGFR3 서열 사이에 상응하는 잔기를 확인하기 위해 FGFR3 서열을 정렬하는 방법, 예를 들어 FGFR3-IIIb에서의 R248 위치에 상응하는 FGFR3에서의 위치를 확인하기 위해 FGFR3-IIIc 서열을 FGFR3-IIIb 서열과 정렬하는 방법을 이해한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{R248C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{R248C}를 억제한다.
- [0021] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{K652E}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제한다. 편의상, 용어 "FGFR3-IIIb^{K652E}에 상응하는 돌연변이를 포함하는"은 FGFR3-IIIb^{K652E} 및 FGFR3-IIIc^{K650E}, 및 FGFR3-IIIb K652에 상응하는 위치에 K → E 돌연변이를 포함하는 추가의 FGFR3 형태를 포함하는 것으로 이해된다. 당업자는 각각의 FGFR3 서열 사이에 상응하는 잔기를 확인하기 위해 FGFR3 서열을 정렬하는 방법, 예를 들어 FGFR3-IIIb에서의 K652 위치에 상응하는 FGFR3에서의 위치를 확인하기 위해 FGFR3-IIIc 서열을 FGFR3-IIIb 서열과 정렬하는 방법을 이해한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{K652E} 및/또는 FGFR3-IIIc^{K650E}를 억제한다.
- [0022] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{S249C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제한다. 편의상, 용어 "FGFR3-IIIb^{S249C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는"은 FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIc^{S249C}, 및 FGFR3-IIIb S249에 상응하는 위치에 S → C 돌연변이를 포함하는 추가의 FGFR3 형태를 포함하는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{S249C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{S249C}를 억제한다.
- [0023] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{G372C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제한다. 편의상, 용어 "FGFR3-IIIb^{G372C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는"은 FGFR3-IIIb^{G372C} 및 FGFR3-IIIc^{G370C}, 및 FGFR3-IIIb G372에 상응하는 위치에 G → C 돌연변이를 포함하는 추가의 FGFR3 형태를 포함하는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{G372C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{G370C}를 억제한다.
- [0024] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{Y375C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 억제한다. 편의상, 용어 "FGFR3-IIIb^{Y375C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는"은 FGFR3-IIIb^{Y375C} 및 FGFR3-IIIc^{Y373C}, 및 FGFR3-IIIb S249에 상응하는 위치에 S → C 돌연변이를 포함하는 추가의 FGFR3 형태를 포함하는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb^{Y375C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{Y373C}를 억제한다.
- [0025] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 (a) FGFR3-IIIb^{K652E} 및 (b) FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIb^{G372C} 중 하나 이상을 억제한다.
- [0026] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 (a) FGFR3-IIIc^{K650E} 및 (b) FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C} 및 FGFR3-IIIc^{G370C} 중 하나 이상을 억제한다.
- [0027] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 (a) FGFR3-IIIb^{R248C} 및 (b) FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIb^{G372C} 중 하나 이상을 억제한다.
- [0028] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 (a) FGFR3-IIIc^{R248C} 및 (b) FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C} 및 FGFR3-IIIc^{G370C} 중 하나 이상을 억제한다.

- [0029] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 (a) FGFR3-IIb^{G372C} 및 (b) FGFR3-IIb^{K652E}, FGFR3-IIb^{Y375C}, FGFR3-IIb^{S249C} 및 FGFR3-IIb^{R248C} 중 하나 이상을 억제한다.
- [0030] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 (a) FGFR3-IIc^{G370C} 및 (b) FGFR3-IIc^{K650E}, FGFR3-IIc^{Y373C}, FGFR3-IIc^{S249C} 및 FGFR3-IIc^{R248C} 중 하나 이상을 억제한다.
- [0031] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIb^{R248C}, FGFR3-IIb^{K652E}, FGFR3-IIb^{Y375C}, FGFR3-IIb^{S249C} 및 FGFR3-IIb^{G372C}를 억제한다.
- [0032] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3-IIc^{R248C}, FGFR3-IIc^{K650E}, FGFR3-IIc^{Y373C}, FGFR3-IIc^{S249C} 및 FGFR3-IIc^{G370C}를 억제한다.
- [0033] 한 측면에서, 본 발명은
- [0034] (a) (i) 서열 A1-A11 (여기서, A1-A11은 RASQVDVTSLA (서열 87)임)을 포함하는 HVR-L1,
- [0035] (ii) 서열 B1-B7 (여기서, B1-B7은 SASFLYS (서열 88)임)을 포함하는 HVR-L2,
- [0036] (iii) 서열 C1-C9 (여기서, C1-C9는 QQSTGHPQT (서열 89)임)를 포함하는 HVR-L3,
- [0037] (iv) 서열 D1-D10 (여기서, D1-D10은 GFTFTSTGIS (서열 84)임)을 포함하는 HVR-H1,
- [0038] (v) 서열 E1-E18 (여기서, E1-E18은 GRIYPTSGSTNYADSVKG (서열 85)임)을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0039] (vi) 서열 F1-F20 (여기서, F1-F20은 ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (서열 86)임)을 포함하는 HVR-H3
- [0040] 으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 추가 변 영역 (HVR) 서열;
- [0041] (b) 하나 이상의 변이체 HVR (여기서, 변이체 HVR 서열은 서열 1-18, 48-131 및 140-145에 제시된 서열 중 적어도 하나의 잔기 (적어도 2개의 잔기, 적어도 3개 이상의 잔기)의 변형을 포함함)
- [0042] 을 포함하는 단리된 항-FGFR3 항체를 제공한다. 바람직하게는 변형은 치환, 삽입 또는 결실이다.
- [0043] 일부 실시양태에서, HVR-L1 변이체는 하기 위치: A5 (V 또는 D), A6 (V 또는 I), A7 (D, E 또는 S), A8 (T 또는 I), A9 (A 또는 S) 및 A10 (V 또는 L) 중 임의의 조합에서 1-6개 (1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개) 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-L2 변이체는 하기 위치: B1 (S 또는 G), B4 (F 또는 S 또는 T) 및 B6 (A 또는 Y) 중 임의의 조합에서 1-2개 (1개 또는 2개) 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-L3 변이체는 하기 위치: C3 (G 또는 S 또는 T), C4 (T 또는 Y 또는 A), C5 (G 또는 S 또는 T 또는 A), C6 (A 또는 H 또는 D 또는 T 또는 N), C7 (Q 또는 P 또는 S), 및 C8 (S 또는 Y 또는 L 또는 P 또는 Q) 중 임의의 조합에서 1-6개 (1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개) 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-H1 변이체는 하기 위치: D3 (S 또는 T), D5 (W 또는 Y 또는 S 또는 T), D6 (S 또는 G 또는 T) 중 임의의 조합에서 1-3개 (1개, 2개 또는 3개) 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-H2 변이체는 하기 위치: E2 (R 또는 S), E6 (Y 또는 A 또는 L 또는 S 또는 T), E7 (A 또는 Q 또는 D 또는 G 또는 Y 또는 S 또는 N 또는 F), E8 (A 또는 D 또는 G), E9 (T 또는 S), E10 (K 또는 F 또는 T 또는 S), E11 (Y 또는 H 또는 N 또는 I) 중 임의의 조합에서 1-6개 (1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개) 치환을 포함한다.
- [0044] 한 측면에서, 본 발명은
- [0045] (a) (i) 서열 RASQX₁X₂X₃X₄X₅X₆A (여기서, X₁은 V 또는 D이고, X₂는 V 또는 I이고, X₃은 D, E 또는 S이고, X₄는 T 또는 I이고, X₅는 A 또는 S이고, X₆은 V 또는 L임) (서열 146)을 포함하는 HVR-L1,
- [0046] (ii) 서열 X₁ASFLX₂S (여기서, X₁은 S 또는 G이고, X₂는 A 또는 Y임) (서열 147)을 포함하는 HVR-L2,
- [0047] (iii) 서열 QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T (여기서, X₁은 G, S 또는 T이고, X₂는 T, Y 또는 A이고, X₃은 G, S, T 또는 A이고, X₄는 A, H, D, T 또는 N이고, X₅는 Q, P 또는 S이고, X₆은 S, Y, L, P 또는 Q임) (서열 148)을 포함하는 HVR-L3,
- [0048] (iv) 서열 GFX₁FX₂X₃TGIS (여기서, X₁은 S 또는 T이고, X₂는 W, Y, S 또는 T이고, X₃은 S, G 또는 T임) (서열

149)를 포함하는 HVR-H1,

- [0049] (v) 서열 GRIYPX₁X₂X₃X₄X₅X₆YADSVKG (여기서, X₁은 Y, A, L, S 또는 T이고, X₂는 A, Q, D, G, Y, S, N 또는 F이고, X₃은 A, D 또는 G이고, X₄는 T 또는 S이고, X₅는 K, F, T 또는 S이고, X₆은 Y, H, N 또는 I임) (서열 150)을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0050] (vi) 서열 ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (서열 151)을 포함하는 HVR-H3
- [0051] 으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 단리된 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0052] 일부 실시양태에서, HVR-L1은 서열 RASQX₁VX₂X₃X₄VA (여기서, X₁은 V 또는 D이고, X₂는 D, E 또는 S이고, X₃은 T 또는 I이고, X₄는 A 또는 S임) (서열 152)를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-L3은 서열 QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T (여기서, X₁은 S, G 또는 T이고, X₂는 Y, T 또는 A이고, X₃은 T 또는 G이고, X₄는 T, H 또는 N이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 P, Q, Y 또는 L임) (서열 153)을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-H2는 서열 GRIYPX₁X₂GSTX₃YADSVKG (여기서, X₁은 T 또는 L이고, X₂는 N, Y, S, G, A 또는 Q이고, X₃은 N 또는 H임) (서열 154)를 포함한다.
- [0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 단리된 항-FGFR3 항체를 특징으로 하고, 여기서 각각의 HVR은 서열 1-18, 48-131 및 140-145로부터 선택된 서열을 포함하거나 또는 이로부터 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지고, 여기서 서열 1, 7, 13, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 또는 143은 HVR-H1에 해당하고, 서열 2, 8, 14, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127 또는 144는 HVR-H2에 해당하고, 서열 3, 9, 15, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128 또는 145는 HVR-H3에 해당하고, 서열 4, 10, 16, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129 또는 140은 HVR-L1에 해당하고, 서열 5, 11, 17, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130 또는 141은 HVR-L2에 해당하고, 서열 6, 12, 18, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131 또는 142는 HVR-L3에 해당한다.
- [0054] 한 측면에서, 본 발명은 서열 1, 7, 13, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 또는 143의 서열을 포함하는 HVR-H1을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0055] 한 측면에서, 본 발명은 서열 2, 8, 14, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127 또는 144의 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0056] 한 측면에서, 본 발명은 서열 3, 9, 15, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128 또는 145의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0057] 한 측면에서, 본 발명은 서열 4, 10, 16, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129 또는 140의 서열을 포함하는 HVR-L1 영역을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0058] 한 측면에서, 본 발명은 서열 5, 11, 17, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130 또는 141의 서열을 포함하는 HVR-L2 영역을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0059] 한 측면에서, 본 발명은 서열 6, 12, 18, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131 또는 142의 서열을 포함하는 HVR-L3 영역을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0060] 한 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 1, 2, 3을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 4, 5, 6을 함유함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0061] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 7, 8, 9를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 10, 11, 12를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0062] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 13, 14, 15를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 16, 17, 18을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0063] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 48, 49, 50을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 51, 52, 53을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0064] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 54, 55, 56을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 57, 58, 59를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0065] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 60, 61, 62, 63을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 63, 64, 65를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0066] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 66, 67, 68을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 69, 70, 71을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0067] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 72, 73, 74를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 75, 76, 77을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0068] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 78, 79, 80을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 81, 82, 83을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0069] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 84, 85, 86을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 87, 88, 89를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0070] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 90, 91, 92를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 93, 94, 95를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0071] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 96, 97, 98을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 99, 100, 101을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0072] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 102, 103, 104를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 105, 106, 107을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0073] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 108, 109, 110을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 111, 112, 113을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0074] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 114, 115, 116을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 117, 118, 119를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0075] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 120, 121, 122를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 123, 124, 125를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0076] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 126, 127, 128을 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 129, 130, 131을 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0077] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 (여기서, 이들은 각각 순서대로 서열 140, 141, 142를 포함함)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 (여기서, 이들은 각각 순서대로

서열 143, 144, 145를 포함함)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0078] 서열 1-18, 48-131 및 140-145의 아미노산 서열은 도 1에 나타난 바와 같이 개별 HVR에 대해 넘버링되고 (즉, H1, H2 또는 H3), 넘버링은 아래 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템과 일치한다.
- [0079] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 132를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0080] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 133을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0081] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 132를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 133을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다 .
- [0082] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 134를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0083] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 135를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0084] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 139를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0085] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 134를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 135를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0086] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 136을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0087] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 137을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0088] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 136을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 137을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0089] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 138을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0090] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 139를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0091] 또 다른 측면에서, 항-FGFR3 항체는 서열 138을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 139를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0092] 한 측면에서, 본 발명은
- [0093] (a) 서열 SASSSVSYMH (서열 155), SASSSVSYMH (서열 156) 또는 LASQTIGTWLA (서열 157)을 포함하는 HVR-L1,
- [0094] (b) 서열 TWIYDTSILAS (서열 158), RWIYDTSKLAS (서열 159) 또는 LLIYAATSLAD (서열 160)을 포함하는 HVR-L2,
- [0095] (c) 서열 QQWTSNPLT (서열 161), QQWSSYPPT (서열 162) 또는 QQLYSPPT (서열 163)을 포함하는 HVR-L3,
- [0096] (d) 서열 GYSFTDYNMY (서열 164), GYVFTHYNMY (서열 165) 또는 GYAFTSYNMY (서열 166)을 포함하는 HVR-H1,
- [0097] (e) 서열 WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 167), WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 168) 또는 WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (서열 169)를 포함하는 HVR-H2, 및
- [0098] (f) 서열 ASPNYDSSPFAY (서열 170), ARGQGPDFDV (서열 171) 또는 ARWGDYDVGAMDY (서열 172)를 포함하는 HVR-H3
- [0099] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0100] 한 측면에서, 본 발명은
- [0101] (a) 서열 SASSSVSYMH (서열 155)를 포함하는 HVR-L1,
- [0102] (b) 서열 TWIYDTSILAS (서열 158)을 포함하는 HVR-L2,
- [0103] (c) 서열 QQWTSNPLT (서열 161)을 포함하는 HVR-L3,
- [0104] (d) 서열 GYSFTDYNMY (서열 164)를 포함하는 HVR-H1,
- [0105] (e) 서열 WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 167)을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0106] (f) 서열 ASPNYDSSPFAY (서열 170)을 포함하는 HVR-H3

- [0107] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0108] 한 측면에서, 본 발명은
- [0109] (a) 서열 SASSSVSYMH (서열 156)을 포함하는 HVR-L1,
- [0110] (b) 서열 RWIYDTSKLAS (서열 159)를 포함하는 HVR-L2,
- [0111] (c) 서열 QQWSSYPPT (서열 162)를 포함하는 HVR-L3,
- [0112] (d) 서열 GYVFTHYNMY (서열 165)를 포함하는 HVR-H1,
- [0113] (e) 서열 WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 168)을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0114] (f) 서열 ARGQGPFDV (서열 171)을 포함하는 HVR-H3
- [0115] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0116] 한 측면에서, 본 발명은
- [0117] (a) 서열 LASQTIGTWLA (서열 157)을 포함하는 HVR-L1,
- [0118] (b) 서열 LLIYAATSLAD (서열 160)을 포함하는 HVR-L2,
- [0119] (c) 서열 QQLYSPPWT (서열 163)을 포함하는 HVR-L3,
- [0120] (d) 서열 GYAFTSYNMY (서열 166)을 포함하는 HVR-H1,
- [0121] (e) 서열 WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (서열 169)를 포함하는 HVR-H2, 및
- [0122] (f) 서열 ARWGDYDVGAMDY (서열 172)를 포함하는 HVR-H3
- [0123] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0124] 한 측면에서, 본 발명은 (a) (i) 서열 SASSSVSYMH (서열 155)를 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 TWIYDTSILAS (서열 158)을 포함하는 HVR-L2; 및 (iii) 서열 QQWTSNPLT (서열 161)을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄; 및/또는 (b) (i) 서열 GYSFTDYNMY (서열 164)를 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 167)을 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 ASPNYDSSPFAY (서열 170)을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0125] 한 측면에서, 본 발명은 (a) (i) 서열 SASSSVSYMH (서열 156)을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 RWIYDTSKLAS (서열 159)를 포함하는 HVR-L2; 및 (iii) 서열 QQWSSYPPT (서열 162)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄; 및/또는 (b) (i) 서열 GYVFTHYNMY (서열 165)를 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 168)을 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 ARGQGPFDV (서열 171)을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0126] 한 측면에서, 본 발명 (a) (i) 서열 LASQTIGTWLA (서열 157)을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 LLIYAATSLAD (서열 160)을 포함하는 HVR-L2; 및 (iii) 서열 QQLYSPPWT (서열 163)을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄; 및/또는 (b) (i) 서열 GYAFTSYNMY (서열 166)을 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (서열 169)를 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 ARWGDYDVGAMDY (서열 172)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-FGFR3 항체를 제공한다. 본 발명의 항체의 일부 실시양태는 아래 서열 173에 제시된 바와 같은 인간화 4D5 항체 (huMAb4D5-8) (헤르셉틴(HERCEPTIN)®, 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.), 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) (또한, 미국 특허 제6,407,213호 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에서 언급됨)의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser **Arg** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **His** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열 173)

[0127]

[0128]

(HVR 잔기는 밑줄로 표시함)

[0129]

한 실시양태에서, huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 서열은 위치 30, 66 및 91 (상기에서 각각 볼드체/이탤릭체로 나타낸 Asn, Arg 및 His) 중 하나 이상에서 변형된다. 특정 실시양태에서, 변형된 huMAb4D5-8 서열은 위치 30에서 Ser, 위치 66에서 Gly 및/또는 위치 91에서 Ser을 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서 본 발명의 항체는 아래 서열 174에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열 174)

[0130]

[0131]

(HVR 잔기는 밑줄로 표시함)

[0132]

huMAb4D5-8에 대해 치환된 잔기는 볼드체/이탤릭체로 나타낸다.

[0133]

본 발명의 항체는 FGFR3에 대한 결합 활성이 실질적으로 유지되는 한 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 본 발명의 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73, 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/이거나 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (헤르셉틴®, 제넨테크, 인크., 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) (또한, 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,821,337호, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에서 언급됨)의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 이들 항체는 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 huMAb4D5-8의 경쇄 HVR 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (헤르셉틴®, 제넨테크, 인크., 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) (또한, 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,821,337호, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에서 언급됨)의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0134]

한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 서열 19 및 203-205, 20 및 206-208, 21 및 209-211, 22 및 212-214, 23 및 215-217, 24 및 218-220, 25 및 221-223, 26 및 224-226, 27 및 227-229, 28 및 230-232, 29 및 233-235, 30 및 236-238, 31 및 239-241, 32 및 242-244, 33 및 245-247, 34 및 248-250, 35 및 251-253, 36 및 254-256, 및/또는 37 및 257-259의 서열을 포함하고, HVR H1, H2 및 H3 서열은 각각 서열 13, 14 및/또는 15이다. 또 다른 실시양태에서, 프레임워크 서열은 서열 19 및 203-205, 20 및 206-208, 21 및 209-211, 22 및 212-214, 23 및 215-217, 24 및 218-220, 25 및 221-223, 26 및 224-226, 27 및 227-229, 28 및 230-232, 29 및 233-235, 30 및 236-238, 31 및 239-241, 32 및 242-244, 33 및 245-247, 34 및 248-250, 35 및 251-253, 36 및 254-256, 및/또는 37 및 257-259의 서열을 포함하고, HVR H1, H2 및 H3 서열은 각각 서열 48, 49 및/또는 50이다. 또 다른 실시양태에서, 프레임워크 서열은 서열 19 및 203-205, 20 및 206-208, 21 및 209-211, 22 및 212-214, 23 및 215-217, 24 및 218-220, 25 및 221-223, 26 및 224-226, 27 및 227-229, 28 및 230-232, 29 및 233-235, 30 및 236-238, 31 및 239-241, 32 및 242-244, 33 및 245-247, 34 및 248-250, 35 및 251-253, 36 및 254-256, 및/또는 37 및 257-259의 서열을 포함하고, HVR H1, H2 및 H3 서열은 각각 서열 84, 85 및/또는 86이다. 추가의 실시양태에서, 프레임워크 서열은 서열 19 및 203-205, 20 및 206-208, 21 및 209-211, 22 및 212-214, 23 및 215-217, 24 및 218-220, 25 및

221-223, 26 및 224-226, 27 및 227-229, 28 및 230-232, 29 및 233-235, 30 및 236-238, 31 및 239-241, 32 및 242-244, 33 및 245-247, 34 및 248-250, 35 및 251-253, 36 및 254-256, 및/또는 37 및 257-259의 서열을 포함하고, HVR H1, H2 및 H3 서열은 각각 서열 108, 109 및/또는 110이다.

[0135] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38 및 260-262, 39 및 263-265, 40 및 266-268, 및/또는 41 및 269-271의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 16, 17 및/또는 18이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38 및 260-262, 39 및 263-265, 40 및 266-268, 및/또는 41 및 269-271의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 51, 52 및/또는 53이다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38 및 260-262, 39 및 263-265, 40 및 266-268, 및/또는 41 및 269-271의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 87, 88 및/또는 89이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38 및 260-262, 39 및 263-265, 40 및 266-268, 및/또는 41 및 269-271의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 111, 112 및/또는 113이다.

[0136] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 132의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 133의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 134의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 135의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 136의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 137의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 138의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 139의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0137] 한 측면에서, 본 발명은 하기 아미노산 서열: LAVPAANTVRFRCPA (서열 179) 및/또는 SDVEFHCKVYSDAQ (서열 180)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지는 폴리펩티드에 결합하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.

[0138] 일부 실시양태에서, 항체는 성숙 인간 FGFR3 아미노산 서열의 아미노산 번호 164-178 및/또는 269-283을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지는 폴리펩티드에 결합한다.

[0139] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-FGFR3 항체는 서열 LAVPAANTVRFRCPA (서열 179) 및/또는 SDVEFHCKVYSDAQ (서열 180)과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열에 특이적으로 결합한다.

[0140] 한 측면에서, 본 발명의 항-FGFR3 항체는 FGFR3 IIIb 폴리펩티드의 잔기 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 및/또는 318, 또는 FGFR3 IIIc 폴리펩티드의 동등한 잔기 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합한다. 당업자는 각각의 FGFR3 서열 사이에 상응하는 잔기를 확인하기 위해 FGFR3 서열을 정렬하는 방법을 이해한다. 둘 이상의 잔기의 조합은 임의의 FGFR3 IIIb 폴리펩티드의 잔기 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 및/또는 318, 또는 FGFR3 IIIc 폴리펩티드의 동등한 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3 IIIb 폴리펩티드의 잔기 158, 159, 169, 170, 171, 173, 175, 205, 207, 및/또는 315, 또는 FGFR3 IIIc 폴리펩티드의 동등한 잔기 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 FGFR3 IIIb 폴리펩티드의 잔기 158, 170, 171, 173, 175, 및/또는 315, 또는 FGFR3 IIIc 폴리펩티드의 동등한 잔기 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합한다.

[0141] 한 측면에서, 본 발명은 FGFR3에 대한 결합에 대해 임의의 상기 언급된 항체와 경쟁하는 항-FGFR3 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 FGFR3 상에서 임의의 상기 언급된 항체와 동일한 또는 유사한 에피토프에 결합하는 항-FGFR3 항체를 제공한다.

[0142] 당업계에 공지되어 있고 하기에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 항체의 추가 변 영역을 서술하는 아미노산 위치/경계는 당업계에 공지된 다양한 정의 및 상황에 따라 달라질 수 있다 (이하 기재됨). 가변 도메인 내의 일부 위치는 이들 위치가 하나의 참조 세트 하에서는 추가 변 영역 내인 것으로 간주될 수 있지만, 상이한 참조 세트 하에서는 추가 변 영역을 벗어난 것으로 간주된다는 점에서 하이브리드 추가 변 위치로서 관찰될 수 있다. 이들

위치들 중 하나 이상은 연장된 초가변 영역에서 찾을 수도 있다 (이하에 추가로 정의됨).

- [0143] 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 친화도 성숙 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 또는 scFv이다.
- [0144] 일부 실시양태에서, FGFR3 항체는 Fc 영역을 포함하는 1-아암 항체이며 (즉, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인이 단일 항원 결합 아암을 형성함), 여기서 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체 내에 존재하여 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다. 예를 들어, W02006/015371을 참조한다.
- [0145] 한 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 예를 들어 이중의 비인간, 인간, 또는 인간화 서열 (예를 들어, 프레임워크 및/또는 불변 도메인 서열)에 이식된 비인간 공여자로부터의 항원 결합 서열을 포함하는 항체이다. 한 실시양태에서, 비인간 공여자는 마우스이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 서열은 예를 들어 돌연변이유발법 (예를 들어, 파지 디스플레이 스크리닝 등)에 의해 얻을 수 있는 합성 서열이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 키메라 항체는 뮤린 V 영역 및 인간 C 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 뮤린 경쇄 V 영역이 인간 카파 경쇄에 융합된다. 또 다른 실시양태에서, 뮤린 중쇄 V 영역은 인간 IgG1 C 영역에 융합된다.
- [0146] 본 발명의 인간화 항체는 프레임워크 영역 (FR)에서 아미노산 치환을 갖는 것들 및 이식된 CDR에서 변화를 갖는 친화도 성숙 변이체를 포함한다. CDR 또는 FR 중에 치환된 아미노산은 공여자 또는 수여자 항체에 존재하는 아미노산에 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 증강된 CDC 및/또는 ADCC 기능 및 B-세포 사멸이 포함되는 개선된 이펙터 기능에 이르는 Fc 영역 내의 아미노산 잔기에서의 변화를 추가로 포함한다. 다른 본 발명의 항체에는 안정성을 개선시키는 특정 변화가 있는 것들이 포함된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 감소된 이펙터 기능, 예를 들어 감소된 CDC 및/또는 ADCC 기능 및/또는 감소된 B-세포 사멸을 초래하는 Fc 영역내의 아미노산 잔기 변화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 자연 살해 (NK) 세포 상의 인간 Fc 수용체 및/또는 인간 보체 인자 C1q에 대한 감소된 결합 (예를 들어, 그에 대한 결합 부재)을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 FcγRI, FcγRIIA 및/또는 FcγRIIIA에 대한 감소된 결합 (예를 들어, 그에 대한 결합 부재)을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG 클래스 (예를 들어, IgG1 또는 IgG4)에 속하며, E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, 및/또는 P329 (EU 인덱스에 따른 넘버링)에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 돌연변이 L234A/L235A 또는 D265A/N297A를 포함한다.
- [0147] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 제US 2003/0157108호 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 하코 고교 캄파니, 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))도 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내의 양분화(bisecting) N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 제6,602,684호 (Umana et al.)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 WO 1997/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 WO 1998/58964 (Raju, S.) 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조한다. 글리코실화가 변형된 항원-결합 분자에 대한 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 또한 참조한다. 한 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 임의의 항원 결합 서열을 포함하는 FGFR3 결합 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 FGFR3 결합 폴리펩티드는 FGFR3, 예를 들어 인간 및/또는 cyno 및/또는 마우스 FGFR3에 특이적으로 결합한다.
- [0148] 본 발명의 항체는 FGFR3 (예를 들어, FGFR3-IIIb 및/또는 FGFR3-IIIc)에 결합 (예컨대 특이적으로 결합)하고, 일부 실시양태에서, FGFR3 신호전달 (예컨대 FGFR3 인산화) 및/또는 임의의 생물학적으로 관련된 FGFR3 및/또는 FGFR3 리간드 생물학적 경로의 파괴, 및/또는 종양, 세포 증식성 장애 또는 암의 치료 및/또는 예방; 및/또는 FGFR3 발현 및/또는 활성 (예컨대 증가된 FGFR3 발현 및/또는 활성)과 관련된 장애의 치료 또는 예방 중 하나 이상의 측면을 조정 (예를 들어, 억제)할 수 있다. 일부 실시양태에서, FGFR3 항체는 FGFR3 (예를 들어, 인간 또는 마우스 FGFR3)으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 1×10^{-7} M의 Kd로 또는 이보다 더 강하게 FGFR3에 특이적으로 결합한다.
- [0149] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-FGFR3 항체는 미국 특허 공개공보 제2005/0147612호에 기재된 항-FGFR3 항체

(예를 들어, 항체 MSPRO2, MSPRO12, MSPRO59, MSPRO11, MSPRO21, MSPRO24, MSPRO26, MSPRO28, MSPRO29, MSPRO43, MSPRO55), 문헌 [Rauchenberger et al., J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003)]에 기재된 항체; PCT 공개공보 제WO2006/048877호에 기재된 항체 (예를 들어, 항체 PRO-001), 문헌 [Martinez-Torrecuadrada et al., Mol Cancer Ther (2008) 7(4): 862-873]에 기재된 항체 (예를 들어, scFv αFGFR3 3C), 문헌 [Direnzo, R et al. (2007) Proceedings of AACR Annual Meeting, Abstract No. 2080]에 기재된 항체 (예를 들어, D11), 또는 WO 2010/002862에 기재된 항체 (예를 들어, 항체 15D8, 27H2, 4E7, 2G4, 20B4)가 아니다.

- [0150] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항체 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 담체는 제약상 허용되는 담체이다.
- [0151] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 FGFR3 항체를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0152] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0153] 추가의 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 핵산 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 담체는 제약상 허용되는 담체이다.
- [0154] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 벡터는 임의의 유형의 것, 예를 들어 재조합 벡터, 예컨대 발현 벡터일 수 있다. 임의의 다양한 숙주 세포를 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*)이다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 예컨대 차이나이스 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포이다.
- [0155] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 항-FGFR3 항체 (본원에 정의된바와 같이 전장 항체 및 그의 단편 포함)의 제조 방법을 제공하고, 상기 방법은 적합한 숙주 세포에서 항체를 코딩하는 본 발명의 재조합 벡터를 발현시키는 것, 및 항체를 회수하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 핵산이 발현되도록 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항체를 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 숙주 세포 배양 배지로부터 회수된다. 일부 실시양태에서, 방법은 인간화 항체를 포함하는 제약 제제를 제조하기 위해 회수된 항체를 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 담체와 조합하는 것을 추가로 포함한다.
- [0156] 한 측면에서, 본 발명은 용기; 및 용기 내에 함유된, 본 발명의 하나 이상의 FGFR3 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제조품을 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본 발명의 핵산을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 일부 실시양태에서 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제조품은 조성물 (예를 들어, 항체)을 개체에게 투여하기 위한 지침 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 방법에 대한 지침)을 추가로 포함한다.
- [0157] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항-FGFR3 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 완충제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 완충제는 제약상 허용가능하다. 한 실시양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 일부 실시양태에서 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 조성물 (예를 들어, 항체)을 개체에게 투여하기 위한 지침을 추가로 포함한다.
- [0158] 추가의 측면에서, 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 본 발명의 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0159] 추가의 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 항-FGFR3 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다.
- [0160] 추가의 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 골격 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 항-FGFR3 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0161] 추가 측면에서, 본 발명은 세포 증식을 감소시키는데 사용하기 위한 본 발명의 항-FGFR3 항체를 제공한다.
- [0162] 추가의 측면에서, 본 발명은 세포를 사멸시키는데 사용하기 위한 본 발명의 항-FGFR3 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 다발성 골수종 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 ADCC에 의해 사멸된다. 일부 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 FGFR3을 과다발현한다.

- [0163] 추가의 측면에서, 본 발명은 세포, 예컨대 다발성 골수종 세포를 고갈시키는데 사용하기 위한 본 발명의 항-FGFR3 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 ADCC에 의해 사멸된다. 일부 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 FGFR3을 과다발현한다.
- [0164] 추가의 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료적 및/또는 예방적 처치를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 항-FGFR3 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다. 일부 실시양태에서, 장애는 골격 장애, 예를 들어 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0165] 한 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료적 및/또는 예방적 처치를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다. 일부 실시양태에서, 장애는 골격 장애, 예를 들어 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0166] 또 다른 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료적 및/또는 예방적 처치를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 발현 벡터의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다. 일부 실시양태에서, 장애는 골격 장애, 예를 들어 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0167] 또 다른 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료적 및/또는 예방적 처치를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다. 일부 실시양태에서, 장애는 골격 장애, 예를 들어 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0168] 추가의 측면에서, 본 발명은 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료적 및/또는 예방적 처치를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 제조품의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다. 일부 실시양태에서, 장애는 골격 장애, 예를 들어 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0169] 한 측면에서, 본 발명은 또한 장애, 예컨대 FGFR3 활성화 및/또는 발현 (일부 실시양태에서, 과다발현)과 관련된 병리적 상태의 치료적 및/또는 예방적 처치를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 키트의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 다발성 골수종 또는 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방암 또는 간암이다. 일부 실시양태에서, 장애는 골격 장애, 예를 들어 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0170] 추가의 측면에서, 본 발명은 세포 증식의 억제를 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 항-FGFR3 항체의 용도를 제공한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 세포 사멸을 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 항-FGFR3 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 다발성 골수종 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 ADCC에 의해 사멸된다. 일부 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 FGFR3을 과다발현한다.
- [0171] 추가의 측면에서, 본 발명은 세포, 예컨대 다발성 골수종 세포의 고갈을 위한 의약의 제조에 있어 본 발명의 항-FGFR3 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 ADCC에 의해 사멸된다. 일부 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 FGFR3을 과다발현한다.
- [0172] 본 발명은 FGFR3의 발현 및/또는 신호전달, 예를 들어 증가된 발현 및/또는 신호전달 또는 원치않는 발현 및/또

는 신호전달과 관련된 장애를 조절하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다.

- [0173] 본 발명의 방법을 이용하여 임의의 적합한 병리적 상태에 영향을 줄 수 있다. 예시적 장애는 본원에 기재되어 있으며, 비소세포 폐암, 난소암, 갑상선암, 고환암, 자궁내막암, 두경부암, 뇌암 (예를 들어, 신경모세포종 또는 수막종), 피부암 (예를 들어, 흑색종, 기저 세포 암종 또는 편평 세포 암종), 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종), 유방 암종, 위암, 결장직장암 (CRC), 간세포 암종, 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 전립선암 및 혈액 악성종양 (예를 들어, T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), B-세포 악성종양, 호지킨 림프종 및 다발성 골수종)으로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장애는 침습성 이행 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 장애는 다발성 골수종이다. 추가의 예시적 장애는 골격 장애, 예컨대 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군을 포함한다.
- [0174] 특정 실시양태에서, 암은 FGFR3, 증폭된 FGFR3, 전위된 FGFR3 및/또는 돌연변이화된 FGFR3을 발현한다. 특정 실시양태에서, 암은 활성화된 FGFR3을 발현한다. 특정 실시양태에서, 암은 전위된 FGFR3 (예를 들어, t(4;14) 전위)을 발현한다. 특정 실시양태에서, 암은 구성적 FGFR3을 발현한다. 일부 실시양태에서, 구성적 FGFR3은 티로신 키나제 도메인 및/또는 막근접 도메인 및/또는 리간드-결합 도메인에서의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 리간드-비의존성 FGFR3을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 리간드-의존성 FGFR3을 발현한다.
- [0175] 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{S248C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{S248C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{S248C}를 발현한다.
- [0176] 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{K652E}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{K652E} 및/또는 FGFR3-IIIc^{K650E}를 발현한다.
- [0177] FGFR3은 FGFR3-IIIb^{S249C}에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{S249C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{S249C}를 발현한다.
- [0178] 한 측면에서, 암은 FGFR3-IIIb^{G372C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{G372C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{G370C}를 발현한다.
- [0179] 한 측면에서, 암은 FGFR3-IIIb^{Y375C}에 상응하는 돌연변이를 포함하는 FGFR3을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{Y375C} 및/또는 FGFR3-IIIc^{Y373C}를 발현한다.
- [0180] 일부 실시양태에서, 암은 (a) FGFR3-IIIb^{K652E} 및 (b) FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIb^{G372C} 중 하나 이상을 발현한다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 암은 (a) FGFR3-IIIb^{R248C} 및 (b) FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIb^{G372C} 중 하나 이상을 발현한다.
- [0182] 일부 실시양태에서, 암은 (a) FGFR3-IIIb^{G372C} 및 (b) FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIb^{R248C} 중 하나 이상을 발현한다.
- [0183] 일부 실시양태에서, 암은 FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} 및 FGFR3-IIIb^{G372C}를 발현한다.
- [0184] 특정 실시양태에서, 암은 대조군 샘플 (예를 들어, 정상 조직의 샘플) 또는 수준에 비해 증가된 수준의 포스포-FGFR3, 포스포-FRS2 및/또는 포스포-MAPK를 발현한다.
- [0185] 일부 실시양태에서, 암은 (예를 들어, 세포 표면 상에서) 세포 당 약 10,000개 이상의 FGFR3 분자 (예컨대, 11,000개, 12,000개, 13,000개, 14,000개, 15,000개, 16,000개, 17,000개, 18,000개 이상의 FGFR3 수용체)을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 약 13000개 FGFR3 분자를 발현한다. 다른 실시양태에서, 암은 약 5000개,

6000개, 7000개, 8000개 이상의 FGFR3 분자를 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 약 4000개, 3000개, 2000개, 1000개 미만, 또는 보다 적은 FGFR3 분자를 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 약 1000개 미만의 FGFR3 분자를 발현한다.

- [0186] 한 실시양태에서, 표적화된 세포는 본 발명의 방법에서 암 세포이다. 예를 들어, 암 세포는 유방암 세포, 결장 직장암 세포, 폐암 세포 (예를 들어, 비소세포 폐암 세포), 갑상선암 세포, 다발성 골수종 세포, 고환암 세포, 유두상 암종 세포, 결장암 세포, 췌장암 세포, 난소암 세포, 자궁경부암 세포, 중추신경계 암 세포, 골원성 육종 세포, 신장 암종 세포, 간세포 암종 세포, 방광암 세포 (예를 들어, 이행 세포 암종 세포), 위 암종 세포, 두경부 편평세포 암종 세포, 흑색종 세포, 백혈병 세포, 다발성 골수종 세포 (예를 들어, t(4:14) FGFR3 전위를 포함하는 다발성 골수종 세포) 및 결장 선종 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화된 세포는 과다증식성 및/또는 과형성 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화된 세포는 전이성 세포이다.
- [0187] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 세포 증식을 억제하는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체에게 유효량의 항-FGFR3 항체를 투여하여 세포 증식을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0188] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 세포를 사멸시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체에게 유효량의 항-FGFR3 항체를 투여하여 세포를 사멸시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 다발성 골수종 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 ADCC에 의해 사멸된다. 일부 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 FGFR3을 과다발현한다.
- [0189] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 세포 (예컨대 다발성 골수종 세포)를 고갈시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체에게 유효량의 항-FGFR3 항체를 투여하여 세포를 사멸시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 ADCC에 의해 사멸된다. 일부 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 FGFR3을 과다발현한다.
- [0190] 한 측면에서, 본 발명은 골격 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 연골무형성증, 저연골형성증, 왜소증, 치사성 이형성증 (TD; 임상 형태 TD1 및 TDII) 또는 두개골유합증 증후군이다.
- [0191] 본 발명의 방법은 부가의 치료 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서는, 방법이 표적화된 세포 및/또는 조직 (예를 들어, 암 세포)을 방사선 치료 또는 화학요법에 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0192] 한 측면에서, 본 발명은 유효량의 또 다른 치료제 (예컨대, 항혈관신생제, 또 다른 항체, 화학요법제, 세포독성제, 면역억제제, 전구약물, 시토키인, 세포독성 방사선요법, 코르티코스테로이드, 항-구토제, 암 백신, 진통제 또는 성장 억제제)와 함께 유효량의 항-FGFR3 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 항-FGFR3 항체는 다양한 신생물성 또는 비신생물성 상태를 치료하기 위해 항암제 또는 항혈관신생제와 함께 사용된다. 특정 예에서, 항-FGFR3 항체는 벨케이드, 레블리미드, 타목시펜, 레트로졸, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 이리노테칸, 세특시맙, 플레비스트란트, 비노렐빈, 베바시주맙, 빈크리스틴, 시스플라틴, 겐시타빈, 메토트렉세이트, 빈블라스틴, 카르보플라틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 페메트렉세드, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 보르테조미드, 레날리도미드, 텍사메타손, 멜팔린, 프레드니손, 빈크리스틴 및/또는 탈리도미드와 함께 사용된다.
- [0193] 치료되어야 할 특정한 암 징후에 의존하여, 본 발명의 조합 요법을 추가의 치료제, 예컨대 화학요법제, 또는 방사선요법 또는 외과수술과 같은 추가의 요법과 조합할 수 있다. 다수의 공지된 화학요법제를 본 발명의 조합 요법에서 사용할 수 있다. 바람직하게는, 특정 적응증의 치료에 대한 표준 화학요법제들이 사용될 것이다. 바람직하게는, 조합되어 사용될 각각의 치료제의 투여량 및 빈도는 다른 작용제(들) 없이 사용되는 경우의 상응하는 작용제의 투여량 또는 빈도와 동일하거나 이보다 낮다.
- [0194] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-FGFR3 항체를 제공하고, 여기서 항-FGFR3 항체는 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0195] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-FGFR3 항체 및 FGFR3의 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 생체내 또는 시험관내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 암 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-FGFR3 항체는 검출가능하게 표지된다.

도면의 간단한 설명

[0196]

도 1A, 1B 및 1C: 항-FGFR3 항체의 중쇄 및 경쇄 HVR 루프 서열. 이들 도면은 중쇄 HVR 서열, H1, H2 및 H3, 및 경쇄 HVR 서열, L1, L2 및 L3을 보여준다. 서열 넘버링은 다음과 같다:

클론 184.6 (HVR-H1은 서열 1이고; HVR-H2는 서열 2이고; HVR-H3은 서열 3이고; HVR-L1은 서열 4이고; HVR-L2는 서열 5이고; HVR-L3은 서열 6임);

클론 184.6.1 (HVR-H1은 서열 7이고; HVR-H2는 서열 8이고; HVR-H3은 서열 9이고; HVR-L1은 서열 10이고; HVR-L2는 서열 11이고; HVR-L3은 서열 12임)

클론 184.6.58 (HVR-H1은 서열 13이고; HVR-H2는 서열 14이고; HVR-H3은 서열 15이고; HVR-L1은 서열 16이고; HVR-L2는 서열 17이고; HVR-L3은 서열 18임)

클론 184.6.62 (HVR-H1은 서열 48이고; HVR-H2는 서열 49이고; HVR-H3은 서열 50이고; HVR-L1은 서열 51이고; HVR-L2는 서열 52이고; HVR-L3은 서열 53임)

클론 184.6.21 (HVR-H1은 서열 54이고; HVR-H2는 서열 55이고; HVR-H3은 서열 56이고; HVR-L1은 서열 57이고; HVR-L2는 서열 58이고; HVR-L3은 서열 59임)

클론 184.6.49 (HVR-H1은 서열 60이고; HVR-H2는 서열 61이고; HVR-H3은 서열 62이고; HVR-L1은 서열 63이고; HVR-L2는 서열 64이고; HVR-L3은 서열 65임)

클론 184.6.51 (HVR-H1은 서열 66이고; HVR-H2는 서열 67이고; HVR-H3은 서열 68이고; HVR-L1은 서열 69이고; HVR-L2는 서열 70이고; HVR-L3은 서열 71임)

클론 184.6.52 (HVR-H1은 서열 72이고; HVR-H2는 서열 73이고; HVR-H3은 서열 74이고; HVR-L1은 서열 75이고; HVR-L2는 서열 76이고; HVR-L3은 서열 77임)

클론 184.6.92 (HVR-H1은 서열 78이고; HVR-H2는 서열 79이고; HVR-H3은 서열 80이고; HVR-L1은 서열 81이고; HVR-L2는 서열 82이고; HVR-L3은 서열 83임)

클론 184.6.1.N54S (HVR-H1은 서열 84이고; HVR-H2는 서열 85이고; HVR-H3은 서열 86이고; HVR-L1은 서열 87이고; HVR-L2는 서열 88이고; HVR-L3은 서열 89임)

클론 184.6.1.N54G (HVR-H1은 서열 90이고; HVR-H2는 서열 91이고; HVR-H3은 서열 92이고; HVR-L1은 서열 93이고; HVR-L2는 서열 94이고; HVR-L3은 서열 95임)

클론 184.6.1.N54A (HVR-H1은 서열 96이고; HVR-H2는 서열 97이고; HVR-H3은 서열 98이고; HVR-L1은 서열 99이고; HVR-L2는 서열 100이고; HVR-L3은 서열 101임)

클론 184.6.1.N54Q (HVR-H1은 서열 102이고; HVR-H2는 서열 103이고; HVR-H3은 서열 104이고; HVR-L1은 서열 105이고; HVR-L2는 서열 106이고; HVR-L3은 서열 107임)

클론 184.6.58.N54S (HVR-H1은 서열 108이고; HVR-H2는 서열 109이고; HVR-H3은 서열 110이고; HVR-L1은 서열 111이고; HVR-L2는 서열 112이고; HVR-L3은 서열 113임)

클론 184.6.58.N54G (HVR-H1은 서열 114이고; HVR-H2는 서열 115이고; HVR-H3은 서열 116이고; HVR-L1은 서열 117이고; HVR-L2는 서열 118이고; HVR-L3은 서열 119임)

클론 184.6.58.N54A (HVR-H1은 서열 120이고; HVR-H2는 서열 121이고; HVR-H3은 서열 122이고; HVR-L1은 서열 123이고; HVR-L2는 서열 124이고; HVR-L3은 서열 125임)

클론 184.6.58.N54Q (HVR-H1은 서열 126이고; HVR-H2는 서열 127이고; HVR-H3은 서열 128이고; HVR-L1은 서열 129이고; HVR-L2는 서열 130이고; HVR-L3은 서열 131임)

클론 184.6.1.NS D30E (HVR-H1은 서열 143이고; HVR-H2는 서열 144이고; HVR-H3은 서열 145이고; HVR-L1은 서열 140이고; HVR-L2는 서열 141이고; HVR-L3은 서열 142임).

아미노산 위치는 하기 기재된 바와 같이 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 2A 및 2B: (A) 항-FGFR3 항체 184.6.1.N54S, 184.6.58 및 184.6.62의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열; 및 (B) 항-FGFR3 항체 1G6, 6G1 및 15B2의 추가변 영역을 도시한다.

도 3A, 3B 및 4: 하기와 같은 서열 식별자로 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적 억제제 인간 컨센서스

프레임워크 서열을 도시한다:

가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 (도 3A, 3B)

인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 19 및 203-205)

인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 20 및 206-208, 21 및 209-211, 22 및 212-214)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 23 및 215-217)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 24 및 218-220, 25 및 221-223, 26 및 224-226)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된

인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 27 및 227-229)

인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 28 및 230-232, 29 및 233-235, 30 및 236-238)

인간 VH 엑셉터 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 31 및 239-241)

인간 VH 엑셉터 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 32 및 242-244, 33 및 2245-247)

인간 VH 엑셉터 2 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 34 및 248-250)

인간 VH 엑셉터 2 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 35 및 251-253, 36 및 254-256, 37 및 257-259)

가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 (도 4)

인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (서열 38 및 260-262)

인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 (서열 39 및 263-265)

인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 (서열 40 및 266-268)

인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 (서열 41 및 269-271)

도 5: huMAb4D5-8 경쇄 (서열 42-45) 및 중쇄 (서열 46, 47, 175, 176)의 프레임워크 영역 서열을 도시한다. 위첨자/볼드체의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 6: huMAb4D5-8 경쇄 (서열 42, 43, 177, 45) 및 중쇄 (서열 46, 47, 178 및 176)의 변형된/변이체 프레임워크 영역 서열을 도시한다. 위첨자/볼드체의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 7: 방광암 세포 RT112에서 FGFR3 억제는 시험관내에서 증식을 억제하고, G1 세포 주기 정지를 유도하고, 생체내에서 종양 성장을 저해한다. 3가지 상이한 FGFR3 shRNA를 Tet-유도가능한 발현 벡터에 클로닝하였다. FGFR3 shRNA 또는 대조군 shRNA를 안정하게 발현하는 RT112 세포를 퓨로마이신 선별로 확립하였다. (A) 독시시클린 (Dox, 0, 0.1 및 1 μ g/ml, 좌측에서 우측으로)의 존재 또는 부재하에 처리된 선별된 클론에서 FGFR3 발현을 보여주는 대표적인 블롯. (B) RT112 안정한 세포에 의한 [^{3} H]-티미딘 혼입. RT112 안정한 클론을 1 μ g/ml 독시시클린의 존재 또는 부재하에 3일 동안 배양한 후에 [^{3} H]-티미딘 (웰 당 1 μ Ci)과 16시간-인큐베이션하였다. 혼입된 [^{3} H]-티미딘의 카운트를 독시시클린 유도하지 않은 세포로부터의 수에 대해 정상화시켰다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (C) RT112 안정한 세포의 DNA 형광 유도 세포측정법 히스토그램. 대조군 shRNA 또는 FGFR3 shRNA4를 발현하는 RT112 클론을 1 μ g/ml 독시시클린의 존재 또는 부재하에 72시간 동안 배양하고, 핵을 프로피듐 요오다이드 (PI)로 염색하였다. 유사한 결과를 FGFR3 shRNA2 및 6에서 획득하였다 (도 16). (D) 마우스에게 5% 수크로스를 단독으로 또는 1 mg/ml 독시시클린을 보충하여 제공하고, 종양 크기를 일주일에 2회 측정하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 유사한 결과를 FGFR3 shRNA2 및 6에서 획득하였다 (도 16). 하부 패널: 대조군 shRNA 또는 FGFR3 shRNA4 안정한 세포 이중이식편 조직으로부터 추출된 종양 용해물에서 FGFR3 단백질의 발현.

도 8: R3Mab는 FGF/FGFR3 상호작용을 차단한다. (A) R3Mab에 의한 인간 FGFR3의 선택적 결합. 인간 FGFR1-4 Fc 키메라 단백질을 고정시키고, 증가하는 양의 R3Mab와 인큐베이션하였다. 특이적 결합을 항-인간 Fab 항체를 사용하여 검출하였다. (B-C) R3Mab에 의한 인간 FGFR3-IIIb (B) 또는 IIIc (C)에 대한 FGF1 결합의 차단. 특이적 결합을 비오틴화된 FGF1-특이적 폴리클로날 항체를 사용하여 검출하였다. (D-E) R3Mab에 의한 인간 FGFR3-IIIb (D) 또는 IIIc (E)에 대한 FGF9 결합의 차단. 특이적 결합을 비오틴화된 FGF9-특이적 폴리클로날 항체를 사용하여 검출하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타내고, 때때로 부호보다 작다.

도 9: R3Mab는 야생형 및 돌연변이화된 FGFR3에 의해 구동되는 Ba/F3 세포 증식을 억제한다. (A) 야생형 인간 FGFR3-IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포의 생존률에 대한 R3Mab의 억제 효과. 세포를 FGF1이 없는 배지에서 (FGF1 부재), 또는 10 ng/ml FGF1 + 10 µg/ml 헤파린 단독의 존재하에 (FGF1), 또는 대조군 항체 (대조군) 또는 R3Mab와 함께 배양하였다. 세포 생존률을 항체와 72시간 인큐베이션한 후에 셀타이터-글로 (프로메가)로 평가하였다. (B) Ba/F3-FGFR3-IIIb^{WT} 안정한 세포에서 R3Mab에 의한 FGFR3 및 MAPK 인산화의 억제. 세포를 15 ng/ml FGF1 및 10 µg/ml 헤파린 (+) 또는 헤파린 단독 (-)으로 10분 동안 처리한 후에, PBS 중 대조군 Ab (Ctrl), 감소하는 양의 R3Mab (각각 1, 0.2, 0.04 µg/ml), 또는 PBS 단독 (Mock)과 3시간 동안 사전-인큐베이션하였다. 용해물을 이뮤노블롯팅하여 각각 pFGFR^{Y653/654} 및 pMAPK^{Thr202/Tyr204}에 대한 항체로 FGFR3 및 p44/42 MAPK의 인산화를 평가하였다. (C) 공개된 데이터에 기초한 방광암에서의 FGFR3 돌연변이 핫 스팟 및 빈도 (도시된 서열 넘버링은 FGFR3 IIIb 이소형 아미노산 서열에 기초함)의 개략도 (32). TM, 막횡단 도메인; TK1 및 TK2, 티로신 키나제 도메인 1 및 2. (D-H) 암-관련 FGFR3 돌연변이체를 발현하는 Ba/F3 세포의 생존률에 대한 R3Mab의 억제 효과. G372C는 IIIc 이소형으로부터 유래하고, 나머지는 IIIb 이소형으로부터 유래하였다. 모든 돌연변이체에 대한 서열 넘버링은 FGFR3 IIIb 이소형 아미노산 서열에 기초한다 (G372C 돌연변이체 포함, 이는 FGFR3 IIIc 이소형 아미노산 서열에 기초하여 넘버링된 G370C일 것임). 세포 생존률을 (A)에 기재된 바와 같이 항체와 72시간 인큐베이션한 후에 평가하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 10: R3Mab에 대한 에피토프 맵핑 및 R3Mab Fab 단편과 인간 FGFR3-IIIb의 IgD2-D3 사이의 복합체의 결정 구조. (A) 인간 FGFR3의 IgD2-D3을 R3Mab에 이어주는 13개 펩티드의 결합에 의해 결정된 에피토프. 각각의 비오틴화된 펩티드를 스트렙타비딘-코팅된 마이크로타이터 웰 상에 포획하고, R3Mab와 인큐베이션하였다. 특이적으로 결합된 R3Mab를 염소 항-인간 IgG 항체를 사용하여 검출하였다. (B) 인간 FGFR1의 세포외 절편 (펩티드 3: HAVPAAKTVKFKCPS (서열 181); 펩티드 11: SNVEFMCKVYSDPQP (서열 182))과 인간 FGFR3 펩티드 3 (LAVPAANTVRFRCPA (서열 179)) 및 11 (SDVEFHCKVYSDAQ (서열 180))의 서열 정렬. 일차 FGF2-FGFR1 상호작용, 헤파린 결합 및 수용체-수용체 결합에 사용되는 FGFR1 잔기를 각각 볼드체, 이탤릭체 및 밑줄체로 나타내었다. FGFR1 잔기의 기능 지정은 [Plotnikov et al. (34)]에 기초하였다. (C) 인간 FGFR3 IgD2-D3 (분자 표면에 나타냄, 백색)과 복합체를 형성한 R3Mab Fab (리본-나선으로 나타냄, 경색 회색, 중색 흑색)의 구조. 리간드 결합 및 이량체화에 관련된 수용체 잔기를 각각 [Plotnikov et al. (34)]에 기초하여 회색/크로스해칭 및 암회색으로 채색하였다. (D) 결정 구조의 확대도는 Fab로부터의 CDR-H3 및 -H2가 FGFR3의 IgD2 및 IgD3과의 주요 상호작용 부위를 구성한다는 것을 보여준다. (E) FGFR3-IIIb-Fab 복합체와 FGFR3-IIIc-FGF1 복합체 (PDB 코드 1RY7)의 중첩. FGFR3-IIIc 및 FGF1을 각각 회색 및 암회색으로 채색하였다. FGFR3-IIIb는 백색으로 나타내고, Fab는 경색을 밝은 회색으로 중색을 암회색으로 나타낸다. IgD2를 중첩을 위한 앵커(anchor)로 사용하였다. 두 구조로부터 잘-중첩된 IgD2 및 R3Mab에 의해 결합되었을 때 FGFR3-IIIb의 IgD3에 의해 채택된 새로운 형태를 주목한다. (F) FGFR3-IIIb-Fab 복합체와 FGFR3-IIIc-FGF1 복합체 (PDB 코드 1RY7)의 중첩의 또 다른 도면. FGFR3-IIIc 및 FGF1을 각각 회색/메쉬 텍스처 및 암회색/점선 텍스처인 분자 표면으로 나타내었다. FGFR3-IIIb는 백색으로 나타내고, Fab는 경색을 회색으로, 중색을 흑색으로 나타낸다. IgD2를 중첩을 위한 앵커로 사용하였다. 두 구조로부터 잘-중첩된 IgD2 및 R3Mab에 의해 결합되었을 때 FGFR3-IIIb의 IgD3에 의해 채택된 새로운 형태를 주목한다.

도 11: R3Mab는 야생형 또는 돌연변이화된 FGFR3^{S249C}를 발현하는 방광암 세포에서 증식, 클론 성장 및 FGFR3 신호전달을 억제한다. (A) 방광암 세포주 RT112에서 R3Mab에 의한 [³H]-티미딘 혼입의 억제. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (B) 배지 단독 (Mock) 또는 대조군 항체 (Ctrl) 처리와 비교한 방광암 세포주 RT112에서의 R3Mab (15 µg/ml)에 의한 FGF1-활성화 FGFR3 신호전달의 차단. 세포 용해물을 항-FGFR3 항체로 면역침전시키고, 항-포스포-티로신 항체 (4G10)로의 FGFR3 인산화에 대해 평가하였다. 용해물을 이뮤노블롯팅하여 AKT (pAKT^{S473}) 및 p44/42 MAPK (pMAPK^{Thr202/Tyr204})의 인산화를 검출하였다. (C) 배지 단독 (Mock) 또는 대조군 항체 (Ctrl) 처

리와 비교한 방광암 세포주 UMUC-14 (FGFR3^{S249C} 보유)에서의 R3Mab (10 μ g/ml)에 의한 클론 성장의 억제. (D) 12개 웰의 복제물로부터 웰 당 직경이 120 μ m보다 큰 콜로니의 개수를 보고하는, (C)의 연구의 정량. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. $P < 3.4 \times 10^{-9}$ 대 Mock 또는 Ctrl. (E) R3Mab (15 μ g/ml)에 의한 UMUC-14 세포에서의 FGFR3 인산화의 억제. FGFR3 인산화를 (B)에서와 같이 분석하였다. 이 세포주에서 FGFR3의 구성적 인산화에 주목한다.

도 12: R3Mab는 이량체-단량체 평형 상태를 단량체 상태를 향해 유도함으로써 디설파이드-연결된 FGFR3^{S249C} 이량체의 정상 상태 수준을 감소시킨다. (A) UMUC-14 세포에서 FGFR3^{S249C} 이량체에 대한 R3Mab의 효과. 세포를 R3Mab (15 μ g/ml) 또는 대조군 항체 (Ctrl)와 3시간 동안 인큐베이션하고, 전체 세포 용해물을 비-환원 및 환원 조건하에 이뮤노블롯에 의해 분석하였다. (B) UMUC-14 세포에서 FGFR3^{S249C} 이량체-단량체 평형 상태에 대한 유리-설프히드릴 차단제 DTNB의 효과. UMUC-14 세포를 증가하는 농도의 DTNB로 3시간 동안 처리하고, 세포 용해물을 (A)에서와 같이 분석하였다. (C) 시험관내에서 정제된 재조합 FGFR3^{S249C} 이량체에 대한 R3Mab의 효과. IgD2-D3으로 구성된 FGFR3^{S249C} 이량체를 크기-배지 칼럼을 통해 정제하고, PBS (Mock), 대조군 항체 (Ctrl) 또는 R3Mab와 37°C에서 인큐베이션하였다. 비-환원 조건하에 이뮤노블롯 분석을 위해 지시된 시점에서 샘플을 수집하였다. FGFR3 이량체-단량체를 항-FGFR3 하이브리도마 항체 6G1을 사용하여 검출하였다 (A-C).

도 13: R3Mab는 방광암 세포의 이종이식편 성장 및 Ba/F3-FGFR3^{S249C}의 동종이식편 성장을 억제한다. (A) 비히클 대조군과 비교한 미리-확립된 RT112 방광암 이종이식편의 성장에 대한 R3Mab의 효과. 군 당 n=10. (B) R3Mab에 의한 RT112 종양 조직에서의 FGFR3 신호전달의 억제. 별도의 실험에서, 15 mg/kg의 대조군 항체 (Ctrl) 또는 R3Mab로 48시간 또는 72시간 처리된 RT112 이종이식편 종양을 수집하고 (군 당 n=3), 균질화하고, 이뮤노블롯에 의해 FRS2 α 및 MAPK 활성화에 대해 분석하였다. (C) 미리-확립된 Ba/F3-FGFR3^{S249C} 동종이식편의 성장에 대한 R3Mab의 효과. 군 당 n=10. (D) 미리-확립된 UMUC-14 방광암 이종이식편의 성장에 대한 R3Mab의 효과, 군 당 n=10. (E) UMUC-14 종양 조직에서 FGFR3^{S249C} 이량체 및 신호전달에 대한 R3Mab의 효과. 30 mg/kg의 대조군 항체 (Ctrl) 또는 R3Mab로 24시간 또는 72시간 처리한 UMUC-14 이종이식편 종양을 수집하고 (군 당 n=3), 균질화하고, 이뮤노블롯에 의해 FGFR3^{S249C} 이량체-단량체 및 MAPK 활성화에 대해 분석하였다. FGFR3 이량체-단량체를 항-FGFR3 토끼 폴리클로날 항체 sc9007을 사용하여 검출하여 종양 용해물에서 마우스 IgG로부터의 간섭을 방지하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 14: ADCC는 t(4;14) 양성 다발성 골수종 모델에서 R3Mab의 항-종양 효능에 기여한다. (A-B) 미리-확립된 OPM2 (A) 및 KMS11 (B) 골수종 이종이식편의 성장에 대한 R3Mab의 효과. 군 당 n=10. (C-F) 세포 배양물에서 R3Mab에 의해 유도된, 골수종 세포주 OPM2 (C) 및 KMS11 (D), 또는 방광암 세포주 RT112 (E) 및 UMUC-14 (F)의 세포용해. 골수종 또는 방광암 세포를 R3Mab 또는 대조군 항체의 존재하에 새로 단리된 인간 PBMC와 인큐베이션하였다. 세포독성은 상청액에 방출된 LDH를 측정하여 결정하였다. (G-H) 미리-확립된 OPM2 (G) 및 KMS11 (H) 골수종 이종이식편의 성장에 대한 R3Mab 또는 그의 DANA 돌연변이체의 효과. 군 당 n=10. 오차 막대는 SEM을 나타내고, 때때로 부호보다 작다.

도 15: siRNA로의 FGFR3의 너다운은 방광암 세포주의 세포 증식을 억제한다. 6 내지 7개의 상이한 FGFR3 siRNA 및 3개의 비특이적 대조군 siRNA를 명명하고, 제넨테크에서 합성하였다. 방광암 세포주 RT112 (A), SW780 (B), RT4 (C) 및 UMUC-14 (D)를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 (웰 당 3000개 세포), 밤새 부착시키고, RNAiMax (인비트로젠(Invitrogen))와 함께 25 nM siRNA로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후에, [³H]-티미딘 (웰 당 1 μ Ci)을 또 다른 16시간 인큐베이션 동안 배양물에 첨가하였다 (A, C 및 D). 혼입된 [³H]-티미딘을 탑카운트(TopCount)로 정량하였다. 데이터를 RNAiMax 단독 (Mock)으로 형질감염된 세포로부터의 데이터에 대해 정상화시켰다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 하부 패널: siRNA 형질감염된 세포에서 FGFR3 발현을 나타내는 대표적인 블롯. (B) 세포 생존률을 형질감염 96시간 후에 셀타이터-글로 (프로메가)로 측정하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 16: 방광암 세포주 RT112에서 FGFR3 너다운은 시험관내에서 G1 세포 주기 정지를 유도하고, 생체내에서 종양 성장을 저해한다. 3가지 상이한 FGFR3 RNA를 설계하고, Tet-유도가능한 shRNA 발현 레트로바이러스 벡터에 클로닝하였다. FGFR3 shRNA 또는 대조군 shRNA를 발현하는 RT112 안정한 클론을 퓨로마이신 선별로 확립하였다.

(A) 1 $\mu\text{g/ml}$ 독시시클린의 존재 또는 부재하에 72시간 동안 처리한 후 FGFR3 shRNA2 또는 shRNA6을 발현하는 RT112 안정한 세포로부터 수득한 프로피듐 요오다이드 (PI)-염색된 핵의 DNA 형광 유동 세포측정법 히스토그램. (B) nu/nu 마우스에서 FGFR3 shRNA2-4 (처리군 당 n=11) 또는 FGFR3 shRNA6-16 (처리군 당 n=10)을 발현하는 RT112 안정한 세포의 성장. 종양 보유 마우스에게 5% 수크로스 단독 (솔리드 원형) 또는 5% 수크로스 + 1 mg/ml 독시시클린 (솔리드 정사각형)을 투여하고, 종양을 캘리퍼로 일주일에 2회 측정하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 17: 야생형 및 돌연변이화된 FGFR3에 의해 구동되는 Ba/F3 세포 증식에 대한 항-FGFR3 하이브리도마 항체 16G, 6G1 및 15B2의 효과. BALB/c 마우스를 인간 FGFR3-IIIb/Fc 또는 인간 FGFR3-IIIc/Fc 키메라로 면역화시켜 항-FGFR3 하이브리도마 항체를 생성하였다. 클로나셀(Clonacell)® 하이브리도마 선별 키트 (스텝셀 테크놀로지스, 인크.(StemCell Technologies, Inc.)) 캐나다 브리시타 컬럼비아주 밴쿠버)로부터의 배지 D 중 하이포잔틴-아미노프테린-티미딘 선별을 사용하여 융합된 하이브리도마 세포를 선별하였다. 하이브리도마 항체를 ELISA에 의해 FGFR3-IIIb 및 FGFR3-IIIc에 결합하는 능력에 대해, 그리고 FACS에 의해 세포 표면 FGFR3을 인식하는 능력에 대해 순차적으로 스크리닝하였다. 이어서, 선별된 하이브리도마를 제한 희석에 의해 클로닝하였다. 16G, 6G1 및 15B2가 도 9A에 기재된 바와 유사하게 야생형 또는 돌연변이화된 FGFR3을 발현하는 Ba/F3 세포의 증식에 대한 효과를 평가하는데 사용된 클론이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 18: 펩티드 맵핑 및 결정 구조 분석에 의해 결정된 R3Mab 에피토프의 비교. (A) 인간 FGFR3의 세포외 IgD2-D3 절편과 복합체를 형성한 R3Mab Fab 단편의 구조에 의해 밝혀진 에피토프. Fab 중쇄 및 경쇄에 의해 접촉된 FGFR3 잔기를 각각 흑색 및 회색으로 채색하였다. (B) FGFR3 상의 펩티드 3 및 11의 위치.

도 19: R3Mab는 야생형 또는 돌연변이화된 FGFR3^{S249C}를 함유하는 방광암 세포에서 증식 및 FGFR3 신호전달을 억제한다. (A) 방광암 세포주 RT4에서 R3Mab에 의한 세포 생존율의 억제. 세포 생존율을 항체와 96시간 인큐베이션 후 셀타이터-글로 (프로메가)로 평가하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (B) 방광암 세포주 RT4에서 R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$)에 의한 FGF1-활성화 FGFR3 신호전달의 차단. (C) 방광암 세포주 RCC-97-7 (FGFR3^{S249C} 함유)에서 R3Mab에 의한 [³H]-티미딘 혼입의 억제. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (D) R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$)에 의한 TCC-97-7 세포에서의 FGFR3 인산화의 억제. (E) 대조군 항체 (Ctrl)와 비교한 R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$)와의 3시간 인큐베이션 후의 TCC-97-7 세포에서의 FGFR3^{S249C} 이량체의 감소.

도 20: UMUC-14 세포에서 R3Mab 및 FGFR3^{S249C} 이량체의 내재화에 대한 엔도시토시스 억제제의 효과. (A) R3Mab의 내재화에 대한 엔도시토시스 억제제의 효과. 다양한 엔도시토시스 억제제 또는 DMSO로 1시간 동안 37°C에서 미리-처리된 UMUC-14 세포를 R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$)와 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션하여 내재화시켰다. 낮은 pH 세척을 사용하여 세포 표면 R3Mab를 제거함으로써, 내재화된 항체를 가시화하였다. 세포를 고정시키고, 알렉사 488-표지된 항-인간 IgG로 염색하였다. 공초점 현미경으로 영상을 촬영하였다. (B) R3Mab로 처리된 UMUC-14 세포에서 FGFR3^{S249C} 이량체에 대한 엔도시토시스 억제제의 효과. 다양한 엔도시토시스 억제제 또는 DMSO로 1시간 동안 37°C에서 미리-처리된 UMUC-14 세포를 mock (레인 1), 대조군 항체 (레인 2) 또는 R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$, 레인 3)와 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포 용해물을 이뮤노블롯에 의해 비-환원 또는 환원 조건하에 FGFR3 단백질에 대해 분석하였다. 클로르프로마진 (클라트린-매개된 엔도시토시스의 억제제) 및 게니스테인 (엔도시토시스의 pan-억제제)이 R3Mab 내재화를 차단하였으나, FGFR3^{S249C} 이량체의 R3Mab-유도된 감소에 대해 영향을 미치지 않는다는 것에 주목한다.

도 21: 비-환원 조건하에 단량체 및 이량체 FGFR3^{S249C}를 향한 상이한 항-FGFR3 항체의 감수성 검출. R3Mab (레인 1), 대조군 IgG1 (레인 2) 또는 PBS (레인 3)로 3시간 동안 처리한 후에 UMUC-14 세포를 용해하고, 세포 용해물을 환원 또는 비-환원 조건하에 이뮤노블롯에 의해 분석하였다. 6G1 (제넨테크에서 생성된 무린 하이브리도마 항체)이 FGFR3^{S249C} 이량체 및 단량체 둘 모두를 검출하는 반면, sc9007 (토끼 폴리클로날 항체, 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)) 또는 sc13121 (무린 하이브리도마 항체, 산타 크루즈 바이오테크놀로지)은 이량체 FGFR3^{S249C}를 우선적으로 검출한다는 것에 주목한다.

도 22: t(4;14)+ 다발성 골수종 세포의 증식에 대한 R3Mab의 효과. (A) UTMC-2 세포에 의한 [³H]-티미딘 혼입에 대한 R3Mab의 억제 효과. UTMC-2 세포를 25 ng/ml FGF9 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 헤파린 또는 헤파린 단독 (FGF9 부재)

의 존재하에 R3Mab 또는 대조군 항체를 함유하는 배지에서 성장시켰다. 6일 인큐베이션 후에, [^{3} H]-티미딘을 16시간 인큐베이션 동안 첨가하였다. 데이터를 FGF9 및 항체의 부재하에 성장한 세포로부터의 데이터에 대해 정상화시켰다. (B-C) OPM2 (B) 및 KMS11 (C) 세포에 의해 [^{3} H]-티미딘 혼입에 대한 R3Mab의 효과. 1.5% FBS 배지에서 성장시킨 세포를 R3Mab 또는 대조군 항체로 6일 동안 처리하였다. 데이터를 비처리 세포로부터의 데이터에 대해 정상화시켰다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 23: 골수종 및 방광암 세포에서 FGFR3의 세포 표면 발현 수준. (A) FACS 분석에 의해 평가된 골수종 세포 및 방광암 세포에서의 세포 표면 FGFR3 발현. 세포를 인간 FGFR3에 대한 피코에리트린-접합된 마우스 mAb (FAB766P, R&D 시스템즈) 또는 피코에리트린-접합된 이소형 대조군 마우스 IgG1 (BD 파밍겐 (BD Pharmingen))로 염색하였다. (B) 골수종 세포 및 방광암 세포에서 FGFR3 농도의 스캐차드(Scatchard) 분석. R3Mab를 방사성요오드화시키고, 과량의 표지되지 않은 항체를 포함하는 현탁액에서 세포와 인큐베이션하였다. RT에서 2시간 동안 인큐베이션한 후에, 세포를 원심분리에 의해 펠릿화하고, 2회 세척하였다. 특이적으로 결합된 ^{125} I를 결정하였다. 수용체 농도 및 결합 친화도 (Kd)는 두 결합 실험으로부터의 평균을 나타낸다.

도 24: 방광 암종 세포의 이중이식편 성장에 대한 R3Mab 또는 그의 DANA 돌연변이체의 효과. (A) 미리-확립된 RT112 종양의 성장에 대한 R3Mab 및 그의 DANA 돌연변이체 (각각 50 mg/kg)의 효과. (B) 미리-확립된 UMUC-14 종양의 성장에 대한 R3Mab 및 그의 DANA 돌연변이체 (각각 50 mg/kg)의 효과. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0197] 본 발명은, 예를 들어 FGFR3의 발현 및/또는 활성, 예컨대 증가된 발현 및/또는 활성 또는 바람직하지 않은 발현 및/또는 활성과 연관된 질환 상태의 치료 또는 예방에 유용한 항-FGFR3 항체를 본원에서 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애를 치료하는데 사용된다.
- [0198] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항-FGFR3 항체는 FGFR3의 검출 및/또는 단리, 예컨대 여러 조직 및 세포 유형에서의 FGFR3의 검출에 사용되는 시약으로서의 유용성이 발견되었다.
- [0199] 본 발명은 추가로, 항-FGFR3 항체 및 항-FGFR3 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 제조 및 사용 방법을 제공한다.
- [0200] 일반적 기술
- [0201] 본원에서 기술되었거나 참조된 기술 및 절차는 당업자에 의해 전통적인 방법론, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003))]; 연속 간행물 [METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))], [Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))]에 기재된 광범위하게 활용되는 방법론을 사용하여 일반적으로 잘 이해되고 통상적으로 사용된다.
- [0202] 정의
- [0203] "단리된" 항체는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다. 항체의 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건하에 SDS-PAGE (나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 의해 균질해질 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 1회 이상의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.
- [0204] "단리된" 핵산 분자는 핵산의 천연 공급원 내에서 통상 연합되는 하나 이상의 오염성 핵산 분자로부터 확인되어 이로부터 분리시킨 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 설정 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 것과 같은 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포의 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하는 경우, 통상적으로 핵산

(예를 들어, 항체 코딩 핵산)을 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0205] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에서 항체 편집물의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제적인 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 이러한 FR 또는 CDR 내로의 삽입에 상응하는 몇 개 적거나 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링 서열과 정렬함으로써 주어진 항체에 대하여 결정할 수 있다.

[0206] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 상기 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서, 2개의 수치값 (일반적으로, 하나는 본 발명의 항체와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관됨) 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주할 만큼 상기 2개의 값 사이에 충분히 높은 정도의 유사성이 있다는 것을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 항체에 대한 값의 함수로서 바람직하게는 약 50% 미만, 바람직하게는 약 40% 미만, 바람직하게는 약 30% 미만, 바람직하게는 약 20% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만이다.

[0207] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유결합에 의한 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내재적 결합 친화도를 나타낸다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 바람직하게는, Kd는 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , 또는 심지어 1×10^{-10} 이거나 또는 이보다 더 강하다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원 및 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이들 중 임의의 방법이 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시양태를 아래에 기재한다.

[0208] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 비표지된 항원의 연속 적정물의 존재하에 (^{125} I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후에 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 분석에서 기재되는 바와 같이 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]), 관심있는 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다. 분석 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (넉 #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125} I]-항원을 관심있는 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심있는 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 실온에서의 인큐베이션 (예를 들어, 1시간 동안)을 위해 포획 플레이트로 전달한다. 이후에, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈(Tween)-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (scintillant) (마이크로신티 (MicroScint)-20; 팩커드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(Topcount) 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다. 다른 실시양태에 따라, Kd 또는 Kd 값은 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25 $^\circ\text{C}$ 에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크. (BIAcore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용함으로써 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 $5 \mu\text{g/ml}$ (약 $0.2 \mu\text{M}$)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 $5 \mu\text{l}$ /분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학

측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유속으로 25°C에서 0.05% 트윈 20이 포함된 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 일부 실시양태에서, 하기 변형을 표면 플라즈몬 공명 검정 방법에 사용하였다: 항체를 대략 400 RU를 달성하도록 CM5 바이오센서 칩에 고정하고, 동역학 측정을 위해 표적 단백질 (예를 들어, FGFR3-IIIb 또는 -IIIc)의 2배 연속 희석액 (67 nM에서 출발함)을 약 30 μl /분의 유속으로 25°C에서 PBST 완충제 내에서 주입한다. 결합 속도 (K_{on}) 및 해리 속도 (K_{off})는 결합 및 해리 센소그램을 동시 핏팅함으로써 단순 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 K_{off}/K_{on} 의 비율로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]을 참조한다. 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광분석기, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도분석기 (아비브 인스트루먼트 (Aviv Instruments)) 또는 적색 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도분석기 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정시 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0209]

본 발명에 따른 "온-레이트" 또는 "결합률" 또는 "결합 속도" 또는 " K_{on} "은 또한 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 상기 기재된 바와 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술로 측정할 수 있다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl /분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유속으로 25°C에서 0.05% 트윈 20이 포함된 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 일부 실시양태에서, 하기 변형을 표면 플라즈몬 공명 검정 방법에 사용하였다: 항체를 대략 400 RU를 달성하도록 CM5 바이오센서 칩에 고정하고, 동역학 측정을 위해 표적 단백질 (예를 들어, FGFR3-IIIb 또는 -IIIc)의 2배 연속 희석액 (67 nM에서 출발함)을 약 30 μl /분의 유속으로 25°C에서 PBST 완충제 내에서 주입한다. 결합 속도 (K_{on}) 및 해리 속도 (K_{off})는 결합 및 해리 센소그램을 동시 핏팅함으로써 단순 1:1 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 K_{off}/K_{on} 의 비율로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]을 참조한다. 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 바람직하게는 분광분석기, 예를 들어 정지 유동 설치 분광광도분석기 (아비브 인스트루먼트) 또는 적색 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도분석기 (써모스펙트로닉)에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정한다.

[0210]

용어 "벡터"는 본원에 사용된 그가 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타내고자 한 것이다. 벡터의 한 종류는 추가의 DNA 절편이 그 내부에 라이게이션될 수 있는 환상 이중가닥 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터가 본원에서 "제조합 발현 벡터" (또는 간단히, "제조합 벡터")로서 지칭된다. 일반적으로, 제조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 서로 구별없이 사용될 수 있는데, 이는 플라스미드가 가장 흔히 사용되는 형태의 벡터이기 때문이다.

[0211]

본원에서 구별없이 사용된 바와 같이, "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 나타내고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 메틸화

뉴클레오타이드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형이 존재하는 경우, 이러한 변형은 중합체의 조립 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열에 비뉴클레오타이드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 합성 후에, 예컨대 표지와와의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 1종 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드의 유사체로의 "캡 (cap)" 치환, 뉴클레오타이드간 변형, 예를 들어 하전되지 않은 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 하전된 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 펜던트 (pendant) 잔기, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (intercalator) (예를 들어, 아크리딘, 프소칼렌 등)를 갖는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)를 함유하는 것, 알킬레이터 (alkylator)를 함유하는 것, 변형 연결기 (예를 들어, 알파 아노머 (anomeric) 핵산 등)를 갖는 것 뿐만 아니라, 폴리뉴클레오타이드(들)의 변형되지 않은 형태를 포함한다. 추가로, 당 내에 통상적으로 존재하는 임의의 히드록실기가 예를 들어 포스포네이트기, 포스포에이트기로 대체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오타이드에 대한 추가의 연결부가 제조되도록 활성화되거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 또는 아민 또는 1개 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑기 잔기로 치환될 수 있다. 다른 히드록실기 표준 보호기로 유도체 화될 수도 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사형, 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴-, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 라이속스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드 등을 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결부가 대안적인 연결기로 대체될 수 있다. 이들 대안적인 연결기는 포스포에이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H이거나 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결기를 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 알릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 교체되는 실시양태를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 연결부가 동일할 필요는 없다. 전술한 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0212] 본원에 사용된 "올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로, 반드시는 아니지만, 일반적으로 길이가 뉴클레오타이드 약 200개 미만으로 짧은, 일반적으로 단일가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오타이드에 동일하고 완전하게 적용가능하다.

[0213] 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 백분율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성 부분으로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린 (Megalign) (디엔에이스타(DNASTAR)) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 결정에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 값 (%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻을 수 있다 (여기서, ALIGN-2 프로그램에 대한 컴퓨터 소스 코드는 아래 표 A에 제공되어 있음). ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네텍, 인크. 소유이며, 소스 코드는 미국 저작권청(Copyright Office) (미국 20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네텍, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가가능하거나 소스 코드 (예를 들어, WO 2007/001851에 제공된 것)로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0214] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (별법으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0215] 100 x X/Y의 분율

- [0216] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 둘 이상의 아미노산 서열이 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 동일하다. 일부 실시양태에서, 둘 이상의 아미노산 서열이 적어도 95%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100% 동일하다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 바로 앞 단락에서 기재한 바와 같이 구한다.
- [0218] 본원에 사용된 용어 "FGFR3"은 구체적으로 또는 문맥상 달리 나타내지 않은 한, 임의의 천연 또는 변이체 (천연 또는 합성) FGFR3 폴리펩티드 (예를 들어, FGFR3-IIIB 이소형 또는 FGFR3-IIIC 이소형)를 나타낸다. 용어 "천연 서열"은 특히 천연 발생 말단절단된 형태 (예를 들어, 세포의 도메인 서열 또는 막횡단 서브유닛 서열), 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 천연-발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 용어 "야생형 FGFR3"은 일반적으로 천연 발생 FGFR3 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "야생형 FGFR3 서열"은 일반적으로 천연 발생 FGFR3에서 발견되는 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0219] 본원에 사용된 용어 "FGFR3 리간드" (교환가능하게 "FGF"로 지칭됨)는 구체적으로 또는 문맥상 달리 나타내지 않은 한 임의의 천연 또는 변이체 (천연 또는 합성) FGFR3 리간드 (예를 들어, FGF1, FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, FGF17, FGF18, FGF23) 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "천연 서열"은 특히 천연 발생 말단절단된 형태 (예를 들어, 세포의 도메인 서열 또는 막횡단 서브유닛 서열), 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 천연-발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 용어 "야생형 FGFR3 리간드"는 일반적으로 천연 발생 FGFR3 리간드 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "야생형 FGFR3 리간드 서열"은 일반적으로 천연 발생 FGFR3 리간드에서 발견되는 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0220] "FGFR3 활성화"는 FGFR3 수용체의 활성화 또는 인산화를 나타낸다. 일반적으로, FGFR3 활성화는 신호 전달 (예를 들어, FGFR3 또는 기질 폴리펩티드 내의 티로신 잔기를 인산화시키는 FGFR3 수용체의 세포내 키나제 도메인에 의해 유발됨)을 야기한다. FGFR3 활성화는 관심있는 FGFR3 수용체에 대한 FGFR 리간드 결합에 의해 매개될 수 있다. FGFR3에 대한 FGFR3 리간드 (예를 들어, FGF1 또는 FGF9)의 결합은 FGFR3의 키나제 도메인을 활성화하여 FGFR3 내 티로신 잔기의 인산화 및/또는 추가의 기질 폴리펩티드(들) 내 티로신 잔기의 인산화를 야기할 수 있다.
- [0221] 수용체 키나제 활성화에 예를 들어 적용되는, 본원에 사용된 용어 "구성적"은 리간드 또는 다른 활성화 분자의 존재에 좌우되지 않는 수용체의 지속적인 신호전달 활성을 나타낸다. 수용체의 특성에 따라, 모든 활성이 구성적일 수 있거나 또는 수용체의 활성이 다른 분자 (예를 들어, 리간드)의 결합에 의해 추가로 활성화될 수 있다. 수용체의 활성화에 이르는 세포 이벤트들이 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 활성화는 더 높은 차수의 수용체 복합체로의 올리고머화, 예를 들어, 이량체화, 삼량체화 등을 포함할 수 있다. 복합체는 단일 종의 단백질을 포함할 수 있고, 즉 동종체성 복합체일 수 있다. 별법으로, 복합체는 2가지 이상의 상이한 단백질 종을 포함할 수 있고, 즉 이종체성 복합체일 수 있다. 예를 들어, 세포 표면 상에서의 정상 형태 또는 돌연변이체 형태의 수용체의 과발현에 의해 복합체 형성이 야기될 수 있다. 수용체 내의 특정 돌연변이 또는 돌연변이들에 의해 복합체 형성이 또한 야기될 수 있다.
- [0222] 수용체 신호전달 활성화에 예를 들어 적용되는, 본원에 사용된 용어 "리간드-비의존성"은 리간드의 존재에 좌우되지 않는 신호전달 활성을 나타낸다. 리간드-비의존성 키나제 활성이 있는 수용체는 키나제 활성의 추가적인 활성화를 일으키기 위해 이러한 수용체에 리간드가 결합하는 것을 반드시 배제하지는 않을 것이다.
- [0223] 예를 들어 수용체 신호전달 활성화에 적용되는, 본원에 사용된 용어 "리간드-의존성"은 리간드의 존재에 의존하는 신호전달 활성을 나타낸다.
- [0224] 어구 "유전자 증폭"은 특정 세포 또는 세포주에서 다수의 카피의 유전자 또는 유전자 단편이 형성되는 과정을 나타낸다. 복제된 영역 (증폭된 DNA의 스트레치)이 종종 "앰플리콘"으로 지칭된다. 대체로, 생성된 메신저 RNA (mRNA)의 양, 즉, 유전자 발현의 수준도 발현되는 특정 유전자로 이루어진 카피의 수에 비례하여 증가한다.
- [0225] "티로신 키나제 억제제"는 FGFR3 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 어느 정도 억제하는 분자이다.

- [0226] "FGFR3 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3을 발현 (과다발현 포함)하고/하거나, FGFR3 유전자를 증폭시키고/시키거나, 다르게는 FGFR3의 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다.
- [0227] "FGFR3 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3의 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다. 이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, ELISA에 의해 FGFR3 인산화를 측정함으로써), 또는 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0228] "구성적 FGFR3 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3의 구성적 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다. 이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, ELISA에 의해 c-FGFR3 인산화를 측정함으로써), 또는 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0229] "FGFR3 증폭을 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3 유전자가 증폭된 것이다.
- [0230] "FGFR3 전위를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, 전위된 FGFR3 유전자를 갖는 것이다. FGFR3 전위의 예는 일부 다발성 골수종 종양에서 발생한 t(4;14) 전위이다.
- [0231] 본원에서의 "포스포-ELISA 검정"은 시약, 일반적으로 항체를 사용하여 인산화된 FGFR3, 기질, 또는 하류 신호전달 분자를 검출하는 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA)에서 하나 이상의 FGFR3, 기질 또는 하류 신호전달 분자의 인산화가 평가되는 검정이다. 일부 실시양태에서, 인산화된 FGFR3 또는 pMAPK를 검출하는 항체가 사용된다. 검정은 바람직하게는 신선한 또는 동결된 생물학적 샘플로부터의 세포 용해물에 대해 수행할 수 있다.
- [0232] "리간드-비의존성 FGFR3 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3의 리간드-비의존성 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다. 이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, ELISA에 의해 FGFR3 인산화를 측정함으로써), 또는 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0233] "리간드-의존성 FGFR3 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3의 리간드-의존성 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다. 이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, ELISA에 의해 FGFR3 인산화를 측정함으로써), 또는 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0234] "리간드-비의존성 FGFR3 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서, FGFR3의 리간드-비의존성 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다. 이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, ELISA에 의해 FGFR3 인산화를 측정함으로써), 또는 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0235] "FGFR3 과다발현 또는 증폭"을 갖는 암 세포는 동일한 조직 종류의 비암성 세포에 비해 유의하게 보다 높은 수준의 FGFR3 단백질 또는 유전자를 갖는 것이다. 이러한 과다발현은 유전자 증폭에 의해 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 초래될 수 있다. FGFR3 과다발현 또는 증폭은 세포의 표면에 존재하는 증가된 수준의 FGFR3 단백질을 (예를 들어, 면역조직화학 검정; IHC를 통해) 평가함으로써 진단 또는 예후 검정에서 결정할 수 있다. 별 방법으로 또는 추가로, 예를 들어 형광 계내 혼성화 (FISH; W098/45479 (1998년 10월 공개) 참조), 서던 블롯팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예컨대 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)을 통해, 세포 내의 FGFR3-코딩 핵산의 수준을 측정할 수 있다. 상기 검정 이외에도, 당업자라면 다양한 생체내 검정을 이용할 수 있다. 예를 들어, 환자의 신체 내에서 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 세포를 노출시킬 수 있고, 환자에서 세포에 대한 항체의 결합은, 예를 들어 방사선용 스캐닝 또는 이전에 항체에 노출된 환자로부터 수득한 생검의 분석에 의해 평가할 수 있다.
- [0236] 본원에 사용된 용어 "돌연변이"는 각각 야생형 단백질 또는 핵산과 비교하여 특정 단백질 또는 핵산 (유전자, RNA)의 아미노산 또는 핵산 서열에서의 차이를 의미한다. 돌연변이된 단백질 또는 핵산은 유전자의 하나의 대립유전자 (이종접합형) 또는 두 대립유전자 (동종접합형)로부터 발현되거나 이러한 대립유전자 상에서 발견될 수 있고, 체세포성 또는 생식계열일 수 있다. 본 발명에서, 돌연변이는 일반적으로 체세포성이다. 돌연변이는 서열 재배열 예컨대 삽입, 결실 및 점 돌연변이 (단일 뉴클레오타이드/아미노산 다형성)를 포함한다.
- [0237] "억제하다"는 참조물과 비교하여 활성, 기능, 및/또는 양을 감소 또는 저하시키는 것이다.
- [0238] 작용제가 관심있는 폴리펩티드 (예를 들어, FGFR 리간드, 예컨대 FGF1 또는 FGF9)의 기능적 활성 중 하나 이상을 모방할 때 작용제는 "효능제 활성 또는 기능"을 보유한다.
- [0239] 본원에 사용된 "효능제 항체"는 관심있는 폴리펩티드 (예를 들어, FGFR 리간드, 예컨대 FGF1 또는 FGF9)의 적어도 하나의 기능적 활성을 모방하는 항체이다.

- [0240] 단백질 "발현"은 유전자 내에 코딩된 정보의 메신저 RNA (mRNA)로, 이어서 단백질로의 전환을 나타낸다.
- [0241] 본원에서, 관심있는 단백질 (예컨대, FGF 수용체 또는 FGF 수용체 리간드)을 "발현하는" 샘플 또는 세포는 단백질을 코딩하는 mRNA, 또는 그의 단편을 포함하는 단백질이 샘플 또는 세포 내에 존재하는 것으로 결정된 것이다.
- [0242] "면역접합체" (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 지칭됨)는 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이들의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)에 접합된 항체를 나타낸다.
- [0243] 본원에 사용된 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 폴리펩티드 서열을 포함하는 이량체 복합체를 일반적으로 나타내고, 이때 C-말단 폴리펩티드 서열은 무손상 항체의 파파인 소화에 의해 수득가능한 것이다. Fc 영역은 천연 또는 변이체 Fc 서열을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 서열의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 서열은 통상적으로 약 위치 Cys226의 아미노산 잔기로부터 또는 약 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 Fc 서열의 카르복실 말단까지 이르는 스트레치로 정의된다. 이뮤노글로불린의 Fc 서열은 일반적으로 CH2 도메인 및 CH3 도메인의 2개의 불변 도메인을 포함하고, 임의로 CH4 도메인을 포함한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 정제 동안, 또는 항체를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 항체를 포함하는 조성물은 K447을 갖는 항체, 모든 K447 잔기가 제거된 항체, 또는 K447 잔기가 존재하는 항체와 K447 잔기가 존재하지 않는 항체의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0244] 본원에서의 "Fc 폴리펩티드"는 Fc 영역을 구성하는 폴리펩티드들 중 하나를 의미한다. Fc 폴리펩티드는 임의의 적합한 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 아형, IgA, IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드는 야생형 힌지 서열의 일부 또는 모두를 포함한다 (일반적으로 N 말단에). 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드는 기능성 또는 야생형 힌지 서열을 포함하지 않는다.
- [0245] "차단" 항체 또는 항체 "길항제"는 이것과 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 저하시키는 것이다. 바람직한 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 완전히 억제한다.
- [0246] "네이키드 (naked) 항체"는 이중 분자, 예를 들어 세포독성 잔기 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 항체이다.
- [0247] 지정된 항체의 "생물학적 특징"을 갖는 항체는 이러한 항체를 동일 항원에 결합하는 다른 항체와 구별시켜 주는, 항체의 하나 이상의 생물학적 특징을 보유하는 항체이다.
- [0248] 관심 항체가 결합하는 항원상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 통상의 교차-차단 검정, 예컨대 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 검정을 수행할 수 있다.
- [0249] 본 발명의 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 샬비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 샬비지 수용체 결합 에피토프를 코딩하는 핵산 분자를 본 발명의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산과 프레임에 맞게 연결시켜서, 조작된 핵산 분자에 의해 발현된 융합 단백질이 샬비지 수용체 결합 에피토프 및 본 발명의 폴리펩티드 서열을 포함하게 할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "샬비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie et al., Ann. Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)]의 표 1). Fc 영역 내에 치환이 있고 혈청 반감기가 증가된 항체가 또한 WO 00/42072, WO 02/060919, 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)]; [Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216 (2004)]에도 기재되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 혈청 반감기는 또한 예를 들어 다른 폴리펩티드 서열을 부착시켜 증가될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 유용한 항체 또는 다른 폴리펩티드를 FcRn 수용체에 결합하는 혈청 알부민 또는 혈청 알부민의 일부, 또는 혈청 알부민 결합 펩티드에 부착시켜서 혈청 알부민이 이러한 항체 또는 폴리펩티드와 결합되도록 할 수 있고, 예를 들어 이러한 폴리펩티드 서열은 WO 01/45746에 기재되어 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 부착될 혈청 알부민 펩티드는 DICLPRWGCLW의 아미노산 서열 (서열 183)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fab의 반감기는 이들 방법에 의해 증가된다. 또한, 혈청 알부민 결합 펩티드 서열에 대해서는 문헌 [Dennis et al. J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002)]을 참조한다.

- [0250] "단편"은 바람직하게는 참조 핵산 분자 또는 폴리펩티드 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상을 함유하는 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 단편은 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 또는 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개 이상의 뉴클레오타이드, 또는 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 120개, 140개, 160개, 180개, 190개, 200개 이상의 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0251] 본 발명의 항체와 관련하여 본원에 사용된 어구 "효능제 기능이 거의 내지 전혀 없는"은 항체가 예를 들어 대상체에게 투여되었을 때 생물학상 의미있는 양의 효능제 활성을 도출하지 않는다는 것을 의미한다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, 활성의 양은 본 발명의 항체와 참조 대응물 사이에 비교가 행해질 수 있는 한, 정량적으로 또는 정성적으로 결정될 수 있다. 활성은 예를 들어 본원에 기재된 것을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 검정 또는 기술에 따라 측정되거나 검출될 수 있다. 본 발명의 항체 및 그의 참조 대응물에 대한 활성의 양은 병행 또는 별도의 진행으로 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 2가 항체는 실질적인 효능제 기능을 보유하지 않는다.
- [0252] 용어 "아포토시스" 및 "아포토시스 활성"은 넓은 의미로 사용되고, 일반적으로 세포질 압축, 형질막 미세융모의 상실, 핵의 분할, 염색체 DNA의 분해 또는 미토콘드리아 기능의 상실을 포함하는 하나 이상의 특징적인 세포 변경이 수반되는 포유동물의 규칙에 따르거나 조절된 세포 치사를 의미한다. 상기 활성은 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 세포 생존률 분석, FACS 분석 또는 DNA 전기영동에 의해, 보다 구체적으로 애넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축 (shrinkage), 소포체 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막 소포 (vesicle) (아포토시스체로 칭함)의 형성에 의해 결정 및 측정될 수 있다.
- [0253] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 보다 상세히 기재되어 있음)을 포함할 수 있다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.
- [0254] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분들이 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타낸다는 사실을 나타내고, 각 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 그러나, 가변성이 항체 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 상보성-결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역으로 칭해지는 3개의 절편에 농축시켰다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 (FR)로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 β -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된, β -시트 형태를 주로 채택한 4개의 FR 영역을 포함한다. 각각의 쇠 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇠로부터의 CDR들과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성하는데 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 것에 직접 수반되지는 않지만, 항체-의존성 세포 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.
- [0255] 항체를 파파인으로 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편 (각각 단일 항원-결합 부위를 가짐) 및 나머지 "Fc" 단편 (이러한 명칭은 쉽게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. 펩신 처리에 의해, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생성된다.
- [0256] "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 2-쇄 Fv 중에서, 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비공유결합에 의해 결합되어 있는 이량체로 구성된다. 단일-쇄 Fv 중에서, 1개의 중쇄 가변 도메인 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서와 유사한 "이량체" 구조로 결합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유결합에 의해 연결될 수 있다. 이러한 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면의 항원 결합 부위를 규정한다. 전체적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0257] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유

하는 Fab'를 나타낸다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0258] 임의의 척추동물 중의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파(κ) 및 람다(λ)라고 불리는 2개의 분명하게 상이한 유형 중 하나로 배정될 수 있다.

[0259] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 이뮤노글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 주요 5개 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스(subclass) (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 라고 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 잘 공지되어 있다. "항체 단편"은 바람직하게는 무손상 항체 내에 존재할 때 그 부분과 정상적으로 연관된 기능의 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 전부를 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 디아바디(diabody), 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 항원과 결합하는 능력을 보유한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은, 무손상 항체 내에 존재하는 경우에 Fc 영역과 통상적으로 연관된 생물학적 기능들, 예를 들어 FcRn 결합성, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합성 중의 한 가지 이상 기능을 보유하고 있다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 이러한 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암(arm)을 포함할 수 있다.

[0260] 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"가 본원에 사용된 경우, 이것은 서열에서 초가변이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역을 포함하는데; VH에 3개가 있고 (H1, H2, H3), VL에 3개가 있다 (L1, L2, L3). 많은 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 변동성에 기초한 것이며, 가장 흔히 사용되고 있다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 이들 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다.

루프 카바트	AbM	코티아	접촉
-----	---	-----	-----
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(카바트 넘버링)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(코티아 넘버링)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0261]

[0262] 초가변 영역은 하기와 같은 "확장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH 내의 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0263] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0264] 비인간 (예를 들어, 뮌) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역

(FR) 잔기를 상응하는 비인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 추가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 하기는 연구 논문 및 그에 인용된 참고문헌도 참조한다: [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)].

[0265] "키메라" 항체 (이뮤노글로불린)는 특정 종으로부터 유래되었거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 있는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부를 가지며, 상기쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되었거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체, 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 있다 (미국 특허 제4,816,567호, 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]). 본원에 사용된, 인간화 항체는 키메라 항체의 하위세트이다.

[0266] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드쇄 내에 존재하는, 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv를 검토하기 위해서는, 문헌 [Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0267] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리 정해진 항원이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 다른 천연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 바람직하게는, 표적 항원은 폴리펩티드이다.

[0268] 용어 "디아바디"는 동일 폴리펩티드쇄 (VH-VL) 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 나타낸다. 동일쇄상의 2개의 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0269] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 그것에 상응하는 아미노산 서열을 갖고/갖거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외된다.

[0270] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어는 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에서 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 설명하고 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위적인 돌연변이유발이 다음 문헌에 기재되어 있다 (문헌 [Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]).

[0271] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 나타내고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0272] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 살해 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-보유 표적

세포에 특이적으로 결합한 후에 상기 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성 형태를 나타낸다. 항체는 세포독성 세포의 "아암"이고 이러한 사멸에 반드시 필요하다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정법, 예컨대 미국 특허 제 5,500,362호 또는 제 5,821,337호 또는 미국 특허 제 6,737,056호 (Presta)에 기재된 것을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 당해 분자의 ADCC 활성을 생체 내에서, 예를 들어, 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0273] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이러한 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리될 수 있다.

[0274] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하며, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 다르게 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RRII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RRIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RRIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]의 개관 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하고 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]), 이뮤노글로불린의 항상성을 조절하는 신생아 수용체 FcRn을 또한 포함한다. WO 00/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 본문이 참고로 본원에 구체적으로 인용된다. 또한, 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다.

[0275] FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, [Ghetie 1997], [Hinton 2004] 참조). 생체 내 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 분석될 수 있다.

[0276] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하에 표적 세포의 용해를 나타낸다. 고전적 보체 경로의 활성화는 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의 항체)에 대한 보체 시스템 제1 성분 (C1q)의 결합으로 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재되어 있는 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0277] 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖고 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 제 6,194,551 B1호 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 이러한 특허 공보의 내용은 본원에 참고로 명확하게 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)]을 참조한다.

[0278] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 이뮤노어드헤신을 나타낸다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)이, 예를 들어, 폴리펩티드의 정제 동안, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 재조합에 의해 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역이 있는 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 K447이 있는 폴리펩티드, 모든 K447이 제거된 폴리펩티드, 또는 K447 잔기가 있는 폴리펩티드와 K447 잔기가 없는 폴리펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0279] 본원의 목적상 "수용체 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크로부터 유래되거나 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 "유래된" 엑셉터 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 기존의 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 기존의 아미노산 변화가 존

재하는 경우에는, 바람직하게 5개 이하, 바람직하게 4개 이하, 또는 3개 이하의 기존의 아미노산 변화가 존재한다. 이미 존재하는 아미노산 변화가 VH에 존재할 경우, 바람직하게는 상기 변화는 위치 71H, 73H 및 78H 중 3개, 2개 또는 1개의 위치에서만 발생하고; 예를 들어, 상기 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A 일 수 있다. 한 실시양태에서, VL 엑셉터 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열 및 서열 면에서 동일하다.

[0280] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선별은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 이러한 서열 하위군은 카바트 등에서의와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서의와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서는, VH의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서의와 같은 하위군 III이다.

[0281] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득된 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 다음 서열 각각의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 184)-H1-WVRQAPGKGLEWV
(서열 185)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 186)-
H3-WGQGTLVTVSS (서열 187)

[0282]

[0283] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득된 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 188)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY
(서열 189)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (서열 190)-
L3-FGQGTKVEIK (서열 191)

[0284]

[0285] 본원에 사용된, "항체 돌연변이체" 또는 "항체 변이체"는 중-의존성 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변형시킨, 항체의 아미노산 서열 변이체를 나타낸다. 이러한 돌연변이체는 중-의존성 항체와 반드시 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 가져야 한다. 한 실시양태에서, 항체 돌연변이체는 중-의존성 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이다. 본원에서, 이러한 서열과 관련된 동일성 또는 유사성은 서열을 정렬하고 필요한 경우에는 최대 서열 동일성(%)을 달성하기 위한 갭(gap)을 도입한 후에 중-의존성 항체 잔기와 동일 (즉, 동일 잔기) 또는 유사한 (즉, 공통적인 측쇄 특성을 기초로 할 때 동일 군으로부터의 아미노산 잔기 - 하기 참조) 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율(%)로서 정의된다. 가변 도메인에 속하지 않는 항체 서열에서의 N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입 어느 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0286] "장애" 또는 "질환"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 이용한 치료로부터 이득을 얻을 수 있는 모든 질환이다. 이것은 포유동물이 해당 장애에 걸리기 쉽게 하는 병리 상태를 포함하는, 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료될 장애의 비제한적인 예로는 악성 및 양성 종양; 암종, 모세포종, 및 육종이 포함된다.

[0287] "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 나타낸다. 치료를 필요로 하는 대상체에는 이미 양성, 전암성 또는 비전이성 종양이 있는 대상체 뿐만 아니라 암의 발생 또는 재발을 방지시키고자 하는 대상체가 포함된다.

[0288] 용어 "치료상 유효량"은 포유동물에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하 위한 치료제의 양을 가리킨다. 암의 경우에, 치료제의 치료상 유효량은 암 세포의 수를 감소시킬 수도 있고/거나; 원발성 종양 크기를 감소시킬 수도 있고/거나; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 정지)할 수도 있고/거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 정지)할 수 있고/거나; 종양 성장을 어느 정도까지 억제할 수도 있고/거나; 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 완화할 수도 있다. 약물이 기존 암 세포의 성장을 예방하고/하거나 기존 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도라면, 이것은 세포증식 억

제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내 효능은 예를 들어 생존 기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응률 (RR), 반응 지속기간, 및/또는 삶의 질을 평가하여 측정될 수 있다.

- [0289] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. 이 정의에는 양성 및 악성 암이 포함된다. "조기 암" 또는 "조기 종양"이란 침습성 또는 전이성이 아닌 암, 또는 0기, I기 또는 II기 암으로서 분류되는 암을 의미한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종 (수모세포종 및 망막모세포종 포함), 육종 (지방육종 및 활막 세포 육종 포함), 신경내분비 종양 (카르시노이드 종양, 가스트린종, 및 도세포 암 포함), 중피종, 슈반세포종 (청신경종 포함), 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평 세포 암 (예를 들어, 상피 편평 세포 암), 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종을 포함하는 폐암, 복막암, 간세포암, 위장암을 포함하는 위장 (gastric) 또는 위 (stomach) 암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암 (전이성 유방암 포함), 결장암, 직장암, 결장 직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장 또는 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담관의 종양, 및 두경부암 및 다발성 골수종을 포함한다.
- [0290] 용어 "전암성"은 전형적으로 암으로 진행되거나 암을 발생시키는 상태 또는 성장을 나타낸다. "전암성" 성장은 비정상적인 세포 주기 조절, 증식 또는 분화를 특징으로 하는 세포를 가질 것인데, 이는 세포 주기 조절, 세포 증식 또는 분화의 마커에 의해 결정될 수 있다.
- [0291] "이형성"은 조직, 장기 또는 세포의 임의의 비정상적인 성장 또는 발생을 의미한다. 바람직하게, 이형성은 고등급 또는 전암성이다.
- [0292] "전이"는 암이 그의 원발성 부위로부터 신체 내 다른 부위로 확산되는 것을 의미한다. 암 세포는 원발성 종양으로부터 분리되어, 림프관 및 혈관 내로 침투하고, 혈류를 통하여 순환하여 신체 내 그 밖의 정상 조직의 원위 중심에서 성장 (전이)할 수 있다. 전이는 국소 또는 원위일 수 있다. 전이는 원발성 종양으로부터 분리된 종양 세포에 우발적으로 발생하고 혈류를 통해 이동하여 원위 부위에서 중단하는 순차적 과정이다. 이러한 새로운 부위에서 상기 세포는 혈류 공급을 확립시키고 성장하여 생명을 위협하는 덩어리를 형성할 수 있다.
- [0293] 종양 세포 내에서의 자극성 분자 경로와 억제성 분자 경로 모두가 이러한 거동을 조절하고, 종양 세포와 원위 부위의 숙주 세포 사이의 상호 작용이 또한 유의하다.
- [0294] "비전이성"은, 양성인 암, 또는 여전히 원발성 부위 내에 있으면서 림프계 또는 혈관계로 침투되지 않았거나 원발성 부위 이외의 조직 내로 침투되지 않은 암을 의미한다. 일반적으로, 비전이성 암은 0, I 또는 II기의 암 및 때때로 III기 암인 임의의 암이다.
- [0295] "원발성 종양" 또는 "원발성 암"은 본래의 암을 의미하고, 대상체 신체 내 또 다른 조직, 장기 또는 위치에 위치하는 전이성 병변이 아니다.
- [0296] "양성 종양" 또는 "양성 암"은 본래의 부위에 국소화된 채로 있고 원위 부위로 침윤, 침습 또는 전이될 수 있는 능력이 갖지 않는 종양을 의미한다.
- [0297] "종양 존재량"은 신체 내 암 세포 수, 종양 크기 또는 암의 양을 의미한다. 종양 존재량은 또한 종양 부하량이라 지칭되기도 한다.
- [0298] "종양 수"는 종양의 수를 의미한다.
- [0299] "대상체"는 인간 또는 비인간 포유동물, 예컨대 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유동물을 의미한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.
- [0300] 용어 "항암 요법"은 암 치료에 유용한 요법을 나타낸다. 항암 치료제의 예로는, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아포토시스 작용제, 항-튜블린 작용제, 및 암을 치료하기 위한 그 밖의 작용제, 항-CD20 항체, 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡™ (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레코시브), 인터페론, 시토카인, 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, B1yS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 다른 생물활성제 및 유기 화학 작용제 등이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 이들의 조합 역시 본 발명에 포함된다.
- [0301] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을

나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, I^{131} , I^{125} , Y^{90} 및 Re^{186}), 화학요법제, 및 독소, 예를 들어 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편을 포함한다.

[0302]

"화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이톡산(CYTOXAN)® 시클로스포스파미드; 알킬술포네이트 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리에틸렌톨로멜라민이 포함되는, 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 아세트게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕타인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스포미드, 에스트라무스틴, 이포스포미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 엔다이인 항생제 (예를 들어, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 감마II 및 칼리키아마이신 오메가II (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 디네미신 (디네미신 A 포함); 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신 뿐만 아니라; 네오키르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 엔다이인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예컨대, 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스포미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예컨대 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 미국 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스포미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 미국 뉴저지주 프린스턴), 아브락산(ABRAXANE)™ 크레모포르-무함유, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 미국 일리노이주 샴버그), 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀 (론-프랑 롤러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로란부실; 겐자르(GEMZAR)® 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스포미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (캄프토사르(Camptosar), CPT-11) (이리노테칸과 5-FU 및 류코보린과의 치료 방식 포함); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 (예컨대, 레티노산); 카페시타빈; 콤레타스타틴; 벨케이드(VELCADE) 보르테조미드; 레블리미드(REVLIMID) 레날리도미드; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴 (옥살리플라틴 치료 방식 (폴폭스(FOLFOX)) 포함); PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바)™) 및 세포 증식을 저하시키는 VEGF-A의 억제제; 및 상기 언급된 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

- [0303] 또한, 상기 정의에는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)® 타목시펜 포함), 탈록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤(FARESTON)·도레미펜, 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린 뿐만 아니라; 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식과 관련이 있는 신호전달 경로에서의 유전자 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf 및 H-Ras; 리보자임, 예를 들어 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예를 들어 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 비노렐빈 및 에스페라마이신 (미국 특허 제 4,675,187호 참조) 및 이들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.
- [0304] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 덜 세포독성이고, 효소에 의해 활성화되거나 전환되어 더욱 활성인 모 형태가 될 수 있는, 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 본 발명의 전구약물은 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형된 전구약물, 글리코실화된 전구약물, β -락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신, 및 더욱 활성이고 세포독성이 없는 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로유리딘 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0305] "방사선 요법"은, 정상적으로 기능하거나 세포를 파괴시키는 능력이 완전히 제한되도록 세포에 대한 충분한 손상을 유도시키기 위해 지정된 감마선 또는 베타선을 사용하는 것을 나타낸다. 당업계에는 투여량 및 치료 기간을 결정하는 수많은 방법이 공지되어 있음을 이해할 것이다. 전형적인 치료는 1회 투여로 제공되며, 전형적인 투여량은 1일 당 10 내지 200 단위 (그레이(Gray))의 범위이다.
- [0306] "생물학적 샘플" ("샘플" 또는 "조직 또는 세포 샘플"이라 상호교환적으로 지칭될 수 있음)은 개체로부터 수득한 다양한 유형의 샘플을 포함하고, 진단 또는 모니터링 검정에 사용할 수 있다. 상기 정의는 생물학적 기원의 혈액 및 다른 액체 샘플, 고체 조직 샘플 예컨대 생검 표본 또는 이로부터 유래된 조직 배양물 또는 세포, 및 그의 자손을 포함한다. 상기 정의는 획득 후 임의의 방식으로, 예컨대 시약으로의 처치, 가용화, 또는 특성 성분, 예컨대 단백질 또는 폴리뉴클레오티드의 강화, 또는 구획화 목적으로 반-고체 또는 고체 매트릭스 내에 매입시키는 것에 의해 조작된 샘플을 또한 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 임상 샘플을 포함하고, 또한 배양 중인 세포, 세포 상등액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생물학적 유체 및 조직 샘플도 포함한다. 생물학적 샘플의 공급원은 신선하고/하거나 동결되고/되거나 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인액으로부터 얻은 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분; 뇌 척수액, 양수, 복수액 또는 간질액과 같은 체액; 임신 또는 개체의 발생 중 임의의 시점으로부터의 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 원발성 또는 전이성 종양으로부터 수득하였다. 생물학적 샘플은 자연계에서는 조직 및 천연적으로 혼합되지 않는 화합물, 예를 들어 보존제, 항-응고제, 완충제, 고정제, 영양분, 항생제 등을 함유할 수 있다.
- [0307] 본원에서의 목적상, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예를 들어 조직 샘플로부터 절단한 조직 또는 세포의 얇은 슬라이스를 의미한다. 조직 샘플의 다수의 절편을 취하여 본 발명에 따른 분석에 사용할 수 있음이 이해된다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플의 동일 절편을 형태적 및 분자적 수준 둘다에서 분석하거나, 단백질과 핵산 둘다에 대하여 분석한다.
- [0308] 용어 "표지"가 본원에 사용된 경우, 이것은 시약, 예컨대 핵산 프로브 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되거나 용해된 화합물 또는 조성물을 나타내고, 그와 접합되거나 용해된 시약의 검출을 용이하게 한다. 표지는 그 자체가 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에

는 기질 화합물 또는 조성물의 검출가능한 화학적 변경을 촉매할 수도 있다.

[0309] 본 발명의 조성물 및 방법

[0310] 본 발명은 항-FGFR3 항체; 및 항-FGFR3 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물 (제약 조성물 포함)을 포함한다. 본원에 사용된 조성물은 FGFR3에 결합하는 하나 이상의 항체, 및/또는 FGFR3에 결합하는 하나 이상의 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 예컨대 완충제를 비롯한 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이것은 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0311] 본 발명은 또한 단리된 항체 및 폴리뉴클레오티드 실시양태를 포함한다. 본 발명은 또한 실질적으로 순수한 항체 및 폴리뉴클레오티드 실시양태를 포함한다.

[0312] 본 발명은 또한 (본원에 기재된 바와 같이 또는 당업계에 공지된 바와 같이) 항-FGFR3 항체를 이용하여 장애, 예를 들어 다발성 골수종 또는 이행 단계 암종 (예를 들어, 침습성 이행 단계 암종)을 치료하는 방법을 포함한다.

[0313] 조성물

[0314] 본 발명의 항-FGFR3 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 본원에서 제공하는 항-FGFR3 항체의 Fab, Fab', Fab'-SH 및 (Fab')₂ 단편 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이러한 항체 단편들은 전통적인 수단, 예컨대 효소에 의한 소화에 의해 생성될 수 있거나, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 이러한 항체 단편은 키메라 항체 단편 또는 인간화 항체 단편일 수 있다. 이러한 단편들은 하기 기재된 진단 및 치료 목적에 유용하다.

[0315] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체의 혼합물이 아니라는 것으로 나타낸다.

[0316] 본 발명의 항-FGFR3 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조할 수 있다.

[0317] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. FGFR3에 대한 항체가 FGFR3 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성된다. FGFR3은 그의 일부가 본원에 추가로 기재된 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 인간 및 마우스 FGFR3의 재조합 생산은 아래 기재된다. 한 실시양태에서, 동물을 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 부분에 융합된 FGFR3으로 면역화시킨다. 바람직한 실시양태에서, FGFR3-IgG1 융합 단백질로 동물을 면역화시킨다. 보통 동물을 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미클레이트 (TDM) (리비 이뮤노캠. 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.), 미국 몬타나주 해밀턴)를 사용하여 FGFR3의 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화시키고, 용액을 여러 부위에 피내로 주사한다. 2주 후, 동물을 부스팅시킨다. 7일 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항-FGFR3 역가에 대해 검정한다. 역가가 정체기(plateaus)에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다.

[0318] 별법으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시킨다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0319] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0320] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선별된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 뮌헨 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 살크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell

Distribution Center)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 미국 메릴랜드주 록빌 소재의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생성과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

- [0321] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 FGFR3에 대한 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 분석법, 예컨대 방사성면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의해 측정한다.
- [0322] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석으로 결정할 수 있다.
- [0323] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.
- [0324] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0325] 본 발명의 항-FGFR3 항체를 조합 라이브러리로 사용함으로써 제조하여 원하는 활성(들)을 갖는 합성 항체 클론을 스크리닝할 수 있다. 원칙적으로, 파지 코트 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 합성 항체 클론이 선별된다. 원하는 항원에 대한 친화도 크로마토그래피에 의해 이러한 파지 라이브러리가 패닝된다. 목적하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론이 항원에 흡착되고, 따라서 라이브러리 내의 비결합 클론으로부터 분리된다. 이후에, 결합 클론이 항원으로부터 용출되고, 항원 흡착/용출의 추가적인 사이클에 의해 추가로 강화될 수 있다. 본 발명의 임의의 항-FGFR3 항체는 관심있는 파지 클론을 선별하는데 적합한 항원 스크리닝 절차를 설계한 후, 관심있는 파지 클론으로부터 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항-FGFR3 항체 클론을 구축함으로써 얻을 수 있다.
- [0326] 항체의 항원-결합 도메인은 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)로부터 각각 하나씩의, 아미노산 약 110개의 2개의 가변 (V) 영역으로부터 형성되고, 둘 모두 3개의 초가변 루프 또는 상보성-결정 영역 (CDR)을 나타낸다. 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL이 짧은 가요성 펩티드를 통해 공유결합에 의해 연결된 단일-쇄 Fv (scFv) 단편으로서, 또는 VH 및 VL이 불변 도메인에 각각 융합되어 비공유결합에 의해 상호작용하는 Fab 단편으로서, 가변 도메인이 파지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에 사용된 scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 총괄적으로 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"으로 지칭된다.
- [0327] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리가 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 별도로 클로닝되어 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합될 수 있고, 그 후 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 클론을 조사할 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 별법으로, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비자가 항원 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공하도록 나이브(naive) 레퍼토리를 클로닝할 수 있다. 마지막으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다.
- [0328] 필라멘트형 파지가 마이너(minor) 코트 단백질 pIII에 대한 융합에 의해 항체 단편을 디스플레이하는데 사용된다. 항체 단편은, 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이, 가요성 폴리펩티드 스페이스에 의해 동일한 폴리펩티드 쇄 상에서 VH 및 VL 도메인이 연결된 단일-쇄 Fv 단편으

로서, 또는 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이, 하나의쇄는 pIII에 융합되고 다른 하나는 박테리아 숙주 세포 주변세포질로 분비되어, 여기서 일부 약생형 코트 단백질을 대체함으로써 Fab-코트 단백질 구조의 어셈블리가 과지 표면 상에 디스플레이되게 되는 Fab 단편들로서 디스플레이될 수 있다.

[0329] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수거된 면역 세포로부터 획득하였다. 항-FGFR3 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 요망되는 경우, 대상을 항체 반응을 생성하도록 FGFR3으로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포 또는 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 제작을 위해 회수한다. 바람직한 실시양태에서, 항-FGFR3 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 FGFR3 면역화가 FGFR3에 대한 인간 항체를 생산하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 갖는 (또한 기능적 내인성 항체 생산 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-FGFR3 항체 반응을 생성함으로써 얻어진다. 인간 항체-생산 트랜스제닉 마우스의 생성은 하기에서 기재된다.

[0330] 적합한 스크리닝 절차를 사용하여 막에 결합된 FGFR3-특이적 항체를 발현하는 B 세포를 단리함으로써, 예를 들어, FGFR3 친화도 크로마토그래피로의 세포 분리 또는 플루오로크롬-표지 FGFR3에 대한 세포의 흡착에 이은 유동-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해, 항-FGFR3 반응성 세포 집단에 대한 추가적인 강화가 획득될 수 있다.

[0331] 별법으로, 비면역화 공여자로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL을 사용함으로써, 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 예시를 제공하고, 또한 FGFR3이 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 구축을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 구축을 포함하는 라이브러리의 경우에는, 개체로부터 줄기 세포를 수확하여 재배열되지 않은 항체 유전자 절편을 코딩하는 핵산을 제공한다. 관심있는 면역 세포는 다양한 동물 종, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 토끼목, 이리, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 조류 종등으로부터 획득될 수 있다.

[0332] 항체 가변 유전자 절편 (VH 및 VL 절편 포함)을 코딩하는 핵산이 관심있는 세포로부터 회수되어, 증폭된다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우에, 원하는 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후에 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서의 역방향 프라이머 및 J-절편을 기초로 하는 정방향 프라이머로, V 유전자가 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 그러나, cDNA로부터의 증폭을 위해, 역방향 프라이머가 문헌 [Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더(leader) 엑손을 기초로 할 수 있고, 정방향 프라이머가 문헌 [Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역을 기초로 할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 축퇴성을 혼입시킬 수 있다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]의 방법에 기재된 바와 같이, 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이, 면역 세포 핵산 샘플에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시키기 위해 각각의 V-유전자 부류에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 라이브러리 다양성이 최대화된 다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 회귀 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 말단에서 태그로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태그가 부착된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.

[0333] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리가 시험관내에서 V 유전자 절편으로부터 유래될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되어 있으며 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 이러한 클로닝된 절편들 (H1 및 H2 루프의 모든 주요 형태 포함)은 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머로 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성시키는데 사용될 수 있다. 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 모든 서열 다양성이 단일 길이의 긴 H3 루프에 초점이 맞춰진 VH 레퍼토리가 또한 제조될 수 있다. 인간 V_K 및 V_L 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 광범위한 VH 및 VL 폴드, 및 L3 및 H3 길이를 기초로 하는 합성 V 유전자 레퍼토리는 상당한 구조적 다양성의 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭에 이어서, 배선 V-유전자 절편이 문헌 [Hoogenboom

and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.

[0334] 항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 서로 다양한 방식으로 조합하여 구축할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 여러 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내 재조합되거나 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 접근법은 이. 콜라이 형질전환 효율로 인한 라이브러리 크기의 한계를 극복하기 위해 Fab 절편의 2쇄 속성을 이용한다. 나이트 VH 및 VL 레퍼토리를 하나는 파지미드에서, 다른 하나는 파지 벡터에서 서로 달리 클로닝한다. 이어서, 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합하여 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하도록 하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 개수에만 한정된다 (약 10^{12} 개 클론). 두 벡터는 VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘에서 재조합되어 파지 비리온 내에 공동패키징되도록 하는 생체내 재조합 신호를 함유한다. 이러한 거대 라이브러리는 양호한 친화도 (K_d^{-1} 가 약 10^{-8} M)를 갖는 다양한 항체를 대량으로 제공한다.

[0335] 별법으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일 벡터 내로 순차적으로 클로닝될 수도 있거나, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 조립된 후에 클로닝될 수도 있다. VH 및 VL DNA를 가요성 펩티드 스페이서를 코딩하는 DNA로 연결시켜 단일-쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성시키는데 PCR 어셈블리가 또한 사용될 수 있다. 또 다른 기술에서는 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이 "세포내 PCR 조립"을 사용하여 VH 및 VL 유전자를 림프구 내에서 PCR로 조합시킨 후에 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝한다.

[0336] 나이트 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생산된 항체는 친화도가 중등도일 수 있지만 (K_d^{-1} 이 약 10^6 내지 10^7 M $^{-1}$), [Winter et al. (1994), 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 제2 라이브러리의 구축 및 이로부터의 재선택에 의해 시험관 내에서 친화도 성숙이 또한 모방될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법으로 오류-유발(error-prone) 중합효소 (문헌 [Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)]에 보고됨)를 사용함으로써 무작위로 시험관내 도입될 수 있다. 추가로, 예를 들어 관심있는 CDR에 스페닝된 무작위 서열을 보유하는 프라이머로 PCR을 사용하여, 선별된 개별적인 Fv 클론에서 하나 이상의 CDR을 무작위로 돌연변이시키고, 친화도가 더 높은 클론을 스크리닝함으로써 친화도 성숙이 수행될 수 있다. WO 96/07754 (1996년 3월 14일 공개)는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성-결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하는 방법을 기재하였다. 또 다른 효과적인 접근법은, 면역화되지 않은 공여자로부터 수득한 천연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 갖는 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 여러 회의 쇄 재셔플링(reshuffling)으로 보다 높은 친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 이러한 기술은 친화도가 10^{-9} M 범위인 항체 및 항체 단편이 생산되도록 한다.

[0337] FGFR3 핵산 및 아미노산 서열은 당업계에 알려져 있다. FGFR3을 코딩하는 핵산 서열은 FGFR3의 바람직한 영역의 아미노산 서열을 사용하여 설계할 수 있다. 당업계에 잘 알려진 바와 같이, FGFR3의 2가지 주요 스플라이스 이소형, FGFR3 IIIb 및 FGFR3 IIIc가 존재한다. FGFR3 서열은 당업계에 잘 알려져 있고, UniProKB/스위스-프로트(Swiss-Prot) 가입 번호 P22607 (FGFR3 IIIc) 또는 P22607_2 (FGFR3 IIIb)의 서열을 포함할 수 있다. FGFR3 돌연변이는 확인되었고, 당업계에 잘 알려져 있으며, 하기 돌연변이를 포함한다 (UniProKB/스위스-프로트 가입 번호 P22607 (FGFR3 IIIc) 또는 P22607_2 (FGFR3 IIIb)에 나타난 서열 참조:

FGFR3-IIIb	FGFR3 IIIc
R248C	R248C
S249C	S249C
G372C	G370C
Y375C	Y373C
G382R	G380R
K652E	K650E

[0338]

- [0339] FGFR3을 코딩하는 핵산은 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해서 제조될 수 있다. 이러한 방법에는 문헌 [Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)]에 기재된 방법들 중 임의의 것, 예컨대 트리에스테르, 포스포이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스포네이트 방법에 의한 화학적 합성이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, FGFR3 코딩 DNA를 설계하는데 발현 숙주 세포가 선호하는 코돈이 사용된다. 별법으로, FGFR3을 코딩하는 DNA는 게놈 또는 cDNA 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0340] FGFR3을 코딩하는 DNA 분자의 작제 후, DNA 분자는 발현 벡터, 예를 들어, 플라스미드 중의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되는데, 여기서, 제어 서열은 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식된다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 숙주 세포와 혼화성인 종으로부터 유래된 복제 및 제어 서열을 함유한다. 통상적으로 벡터는 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 단백질을 코딩하는 서열을 보유한다. 원핵 및 진핵 숙주 세포에서의 발현을 위한 적절한 세포는 당업계에 잘 알려져 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다. 진핵생물, 예컨대 효모, 또는 다세포 생물, 예컨대 포유동물로부터 유래된 세포가 사용될 수 있다.
- [0341] 임의로, FGFR3을 코딩하는 DNA가 분비 리더 서열에 작동가능하게 연결되어, 숙주 세포에 의한 발현 생성물이 배양 배지 내로 분비된다. 분비 리더 서열의 예로는 stII, 에코틴, lamB, 헤르페스 GD, lpp, 알칼리성 포스포타제, 인버타제, 및 알파 인자가 포함된다. 단백질 A의 아미노산 36개의 리더 서열이 본원에 사용하기에 또한 적합하다 (문헌 [Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)]).
- [0342] 숙주 세포가 상기 기재된 본 발명의 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염, 바람직하게는 형질전환되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선별 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하도록 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다.
- [0343] 형질감염은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는지 여부와 상관 없이 숙주 세포 내로 발현 벡터가 들어가는 것을 나타낸다. 수많은 형질감염 방법, 예를 들어, $CaPO_4$ 침전 및 전기천공이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 벡터의 작동의 임의의 지시가 숙주 세포 내에서 일어나는 경우 성공적인 형질감염이 일반적으로 인지된다. 형질감염 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다.
- [0344] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 구성요소에 의해 복제가능하도록 DNA를 생물 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 형질전환 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다.
- [0345] FGFR3을 생산하는데 사용된 원핵 숙주 세포는 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 일반적으로 기재된 바와 같이 배양될 수 있다.
- [0346] 당업계에 잘 알려져 있고, 일부는 본원에서 추가로 기술하는, 다양한 배지 중에서 FGFR3을 제조하는데 사용되는 포유동물 숙주 세포를 배양할 수 있다.
- [0347] 본 명세서에서 언급된 숙주 세포는 시험관내 배양물 내의 세포, 뿐만 아니라 숙주 동물 내에 있는 세포를 포함한다.
- [0348] FGFR3의 정제는 당업계에 인지된 방법을 사용하여 달성될 수 있고, 그의 일부는 본원에서 기재된다.
- [0349] 정제된 FGFR3은 파지 디스플레이 클론의 친화도 크로마토그래피에 의한 분리에서 사용하기 위해 아가로스 비드, 아크릴아미드 비드, 유리 비드, 셀룰로스, 다양한 아크릴계 공중합체, 히드록실 메타크릴레이트 젤, 폴리아크릴계 및 폴리메타크릴계 공중합체, 나일론, 중성 및 이온성 담체 등과 같은 적합한 매트릭스에 부착될 수 있다. FGFR3 단백질을 매트릭스에 부착시키는 것은 [Methods in Enzymology, vol. 44 (1976)]에 기재된 방법에 의해 달성될 수 있다. 단백질 리간드를 다당류 매트릭스, 예를 들어 아가로스, 텍스트란 또는 셀룰로스에 부착시키기 위한 통상적으로 사용되는 기술은 담체를 할로젠화 시아노젠으로 활성화시키고 이어서 펩티드 리간드의 1차 지방족 또는 방향족 아민을 활성화된 매트릭스에 커플링시키는 것을 수반하였다.
- [0350] 별법으로, FGFR3은 흡착 플레이트의 웰을 코딩하는데 사용될 수 있거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에서 발현될 수 있거나 세포 분류에서 사용될 수 있거나, 스트렙타아비딘-코딩된 비드로 포획하기 위해 비오티에 접합될 수 있거나, 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 임의의 다른 방법에서 사용될 수 있다.
- [0351] 파지 입자의 적어도 일부와 흡착제의 결합에 적합한 조건 하에 파지 라이브러리 샘플을 고정된 FGFR3과 접촉시킨다. 일반적으로, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선별된다. 고체상

에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법에 유사한 절차로 FGFR3 항원 경쟁에 의해 용출시킨다. 단일 라운드의 선별로 파지가 20 내지 1,000배 강화될 수 있다. 또한, 강화된 파지가 박테리아 배양에서 성장되어, 추가적인 선별 라운드에 적용될 수 있다.

[0352] 선별 효율은 세정 동안의 해리 동역학, 및 단일 파지 상의 다중 항체 단편들이 동시에 항원과 맞물릴 수 있는지 여부를 비롯한 다수의 인자에 좌우된다. 신속한 해리 동역학 (및 약한 결합 친화도)의 항체는 단시간 세정, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 내의 항원의 높은 코팅 밀도를 사용함으로써 유지될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합을 장려한다. 느린 해리 동역학 (및 양호한 결합 친화도)의 항체의 선별은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)] 및 WO 92/09690에 기재된 바와 같은 1가 파지 디스플레이 및 장시간 세정, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같은 항원의 낮은 코팅 밀도를 사용함으로써 증진될 수 있다.

[0353] FGFR3에 대한 상이한 친화도, 심지어 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체 사이로부터 선택할 수도 있다. 그러나, 선별된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 상기 기재된 친화도 성숙 기술들 중 일부에서 수행되는 바와 같은 돌연변이)는 다수의 돌연변이체를 일으키기 쉽고, 이때 대부분은 항원에 결합하고 몇몇은 친화도가 더 높다. FGFR3를 제한하여, 드문 고친화도 파지를 경쟁시켜 선별할 수 있다. 친화도가 더 높은 모든 돌연변이체를 유지시키기 위해, 파지가 과량의 비오틴화 FGFR3, 그러나 FGFR3에 대한 표적 몰 친화도 상수보다 낮은 몰 농도의 비오틴화 FGFR3과 함께 인큐베이션될 수 있다. 이후에, 고친화도-결합 파지가 스트렙타비딘이 코팅된 상자성 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"으로 항체는 그의 결합 친화도에 따라 선별될 수 있고, 그의 민감도는 친화도가 보다 낮은 매우 과량의 파지로부터 2배 더 높은 수준의 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론의 단리를 허용한다. 고체 상에 결합된 파지를 세정하는데 사용된 조건이 해리 동역학을 기초로 식별하도록 또한 조작될 수 있다.

[0354] FGFR3 클론은 선택된 활성일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 FGFR3 수용체와 그의 리간드 (예컨대 FGF1 및/또는 FGF9) 사이의 결합을 차단하는 FGFR3 항체를 제공한다. 이러한 FGFR3 항체에 반응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 파지 라이브러리로부터 FGFR3 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비차단 활성이 요망되는 FGFR3 및 제2 단백질질을 선별하고; (3) 항-FGFR3 파지 클론을 고정된 FGFR3에 흡착시키고; (4) 과잉의 제2 단백질질을 사용하여 제2 단백질질의 결합 결정자와 중복되거나 공유하는 FGFR3-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용출시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용출시킴으로써 선별할 수 있다. 임의로, 본원에 기재된 선별 절차를 1회 이상 반복함으로써 원하는 차단/비차단 특성을 갖는 클론을 추가로 강화시킬 수 있다.

[0355] 본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 원하는 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열분석된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 원하는 모노클로날 항체의 합성물을 수득하였다. 박테리아에서 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 검토 문헌은 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151 (1992)]을 포함한다.

[0356] 본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 [Kabat et al., 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있음)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이러한 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예를 들어, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 다른 동물 종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 위한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 바람직한 실시양태에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론이 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 모두 인간형인 전장 또는 부분적 길이의 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)이 형성된다.

- [0357] 본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항-FGFR3 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 뮤린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 비이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유결합에 의해 결합시킴으로써 하이브리도마 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.
- [0358] 항체 단편
- [0359] 본 발명은 항체 단편을 포함한다. 특정 상황에서는, 온전한 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 제거가 신속하고, 고형 종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다.
- [0360] 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분비될 수 있고, 이에 의해 다량의 이들 단편을 쉽게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 또 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택 항체는 단일-쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (예를 들어, WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호 참조). Fv 및 scFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이어서, 생체내 사용 동안 비특이적 결합을 감소시키는데 적합하다. scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합체가 생성되도록 scFv 융합 단백질을 구축할 수 있다. [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.
- [0361] 인간화 항체
- [0362] 본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비인간 항체를 인간화하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체에는 비인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있을 수 있다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 "도입(import)" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "도입" 가변 도메인의 것이다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열에 대해 추가변 영역 서열을 치환시킴으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327]; [Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536])을 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 추가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0363] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적-맞춤(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 받아들여진다 (문헌 [Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296]; [Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 복수개의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285]; [Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623]).
- [0364] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해서, 한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불

린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 추가변 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0365] 인간 항체

[0366] 본 발명의 인간 항-FGFR3 항체는 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 기재한 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 구축할 수 있다. 별법으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항-FGFR3 항체는 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)]에 기재되어 있다.

[0367] 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생성 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역(JH) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기술되었다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이러한 배선 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 접종 시 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)]을 참조한다.

[0368] 또한, 유전자 서플링을 사용하여 비인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도할 수 있고, 여기서 인간 항체는 출발 비인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅(imprinting)"으로도 불리는 상기 방법에 따라, 상기한 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 얻은 비인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 비인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라의 집단을 생성시킨다. 항원에 의한 선별 결과로서, 인간 쇄가 1차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비인간 쇄의 제거시에 파괴된 항원 결합 부위를 복원한 비인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되고, 즉, 에피토프가 인간 쇄 파트너의 선택을 좌우(임프린팅)한다. 나머지 비인간 쇄를 대체하기 위해 상기 과정을 반복하는 경우에 인간 항체가 수득하였다(1993년 4월 1일자로 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 인식에 의한 비인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이러한 기술은 비인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전 인간 항체를 제공한다.

[0369] 이중특이적 항체

[0370] 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체인 모노클로날 항체이다. 본 경우에, 결합 특이성들 중 하나는 FGFR3에 대한 것이고, 나머지는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 예시적인 이중특이적 항체는 FGFR3의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체를 사용하여 세포독성제를, FGFR3을 발현하는 세포에 위치시킬 수도 있다. 이들 항체는 FGFR3-결합 아암, 및 세포 독성제(예를 들어, 사포린, 항-인터페론- α , 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토틱세이트 또는 방사능 동위원소 합텐)에 결합하는 아암을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0371] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생성은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 기초로 하고, 이때 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다(문헌 [Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마(쿼드로마(quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이 중에서 오직 1종만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 상기 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고 생성 수율이 낮다. 유사한 절차가 1993년 5월 13일자로 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Trautner et al., EMBO J., 10: 3655 (1991)]에 개시되어 있다.

[0372] 상이하고 더욱 바람직한 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)를 갖는 항체 가변 도메인을

이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합물 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우에는 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3개의 폴리펩티드 쇄의 동일하지 않은 비율이 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 상기 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 쇄의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우, 또는 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우, 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0373] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 세부사항에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0374] 또 다른 접근법에 따라, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동(cavity)"이 제2 항체 분자의 경계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치않는 최종-생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

[0375] 이중특이적 항체에는 가교된 또는 "이중접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체들은, 예를 들어 원치않는 세포에 대한 면역계 세포의 표적화 (미국 특허 제4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/00373 및 EP 03089)를 위해서 제안되었다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이중접합체 항체가 제조될 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에 잘 알려져 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0376] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]에는 무손상 항체를 단백질 가수분해로 절단시켜 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원시켜, 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정을 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0377] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]에서는 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 따로 분리시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링 반응을 실시하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상적인 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0378] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다.

문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바다" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메커니즘을 제공하였다. 상기 단편은 동일쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0379] 2가 초과 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. (문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]).

[0380] 다가 항체

[0381] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 신속하게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 (예를 들어, 4가 항체) 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생성될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역에 대해 아미노 말단인 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서의 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 그러나 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드쇄 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드쇄)를 포함하고, 여기서의 상기 폴리펩티드쇄(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드쇄(들)은 VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 1개의 폴리펩티드쇄이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1임)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드쇄(들)은 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역쇄를 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0382] 항체 변이체

[0383] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 구현된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성을 갖는다는 조건하에 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0384] 돌연변이유발을 위해 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위한 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 대전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 대전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이가 그 자체의 특성을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 이뮤노글로불린을 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0385] 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기가 있는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 (예를 들어, ADEPT) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합체를 포함한다.

- [0386] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 나타낸다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 잔기를 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나가 히드록시 아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다.
- [0387] 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 항체가 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- [0388] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 제US 2003/0157108호 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 하꼬 고교 캄파니, 리미티드)도 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내의 양분화 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 제6,602,684호 (Umana et al.)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 WO 1997/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 WO 1998/58964 (Raju, S.) 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조한다. 글리코실화가 변형된 항원-결합 분자에 대한 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 또한 참조한다.
- [0389] 본원에서의 바람직한 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 없는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 변이체는 ADCC 기능이 개선된다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 더욱 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 추가로 포함한다. "탈푸코실화(defucosylated)" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 관련된 문헌의 예로는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]이 포함된다. 탈푸코실화 항체를 생산하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]); 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1호 (Presta, L.); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 실시예 11), 및 녹아웃(knockout) 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]를 포함한다.
- [0390] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항체 분자 내의 적어도 하나 (적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 이상)의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환성 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 구현된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제하에 표 1에 나타난다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 야기하면, 하기 표 1에 "예시적인 치환"으로 명명되거나 아미노산 클래스를 언급하며 아래에 추가로 기재된 보다 실질적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 1

본래 잔기	예시적 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

[0391]

[0392]

항체의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서, 치환 영역 내의 폴리펩티드 프레임워크의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선별함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기초로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0393]

(1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0394]

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0395]

(3) 산성: asp, glu;

[0396]

(4) 염기성: his, lys, arg;

[0397]

(5) 쇠 배향을 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0398]

(6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0399]

비보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 구성원을 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0400]

치환 변이체의 한 유형에는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기가 치환되는 것이 수반하였다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선별된 생성된 변이체(들)은 이들이 생성되는 모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선될 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략하게, 몇몇 추가변 영역 부위 (예를 들어, 6-7개의 부위)가 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체 변이체가 사상 파지 입자로부터 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물질로서 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하

게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항체 및 항원 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해서는 항원 항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기와 이웃 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체들의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 한가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 갖는 항체를 추가적인 개발을 위해 선별할 수 있다.

[0401] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0402] 본 발명의 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인의 위치를 포함하여 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0403] 본원 명세서 및 선행기술의 교시 내용에 따라, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 상응 항체에 비해, 예를 들어 Fc 영역에 하나 이상의 변형을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고 이러한 항체는 그의 야생형 대응물과 비교하여 치료학적 유용성에 요구되는 실질적으로 동일한 특성을 유지할 것이다. 예를 들어, W099/51642에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 초래할 특정 변경이 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 것으로 생각된다. Fc 영역 변이체의 또 다른 예에 관한 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 W094/29351을 또한 참조한다. W000/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 이러한 특허 공보의 내용은 본원에 참고로 명확하게 포함된다. 또한 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다. 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합성을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. Fc 영역 아미노산 서열이 변경되고 C1q 결합 능력이 증가 또는 감소된 폴리펩티드 변이체가 미국 특허 제6,194,551 B1호, WO 99/51642에 기재되어 있다. 이러한 특허 공보의 내용은 본원에 참고로 명확하게 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.

[0404] 항체 유도체

[0405] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 입수가능한 추가적인 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 잔기는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예에는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체) 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조에 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아닌 고려사항을 기초로 결정될 수 있다.

[0406] 원하는 특성을 갖는 항체에 대한 스크리닝

[0407] 본 발명의 항체는 당업계에 알려져 있는 다양한 검정에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다 (그의 일부가 본원에 개시되어 있음). 일부 실시양태에서, 항체는 FGF (예컨대 FGF1 및/또는 FGF9) 결합의 감소 또는 차단, FGFR3 활성화의 감소 또는 차단, FGFR3 하류 분자 신호전달의 감소 또는 차단, 리간드 (예를 들어, FGF1, FGF9)에 대한 FGFR3 결합의 파괴 또는 차단, FGFR3 이량체화의 감소 또는 차단, 단량체 FGFR3 형성의 증진, 단량체 FGFR3에 대한 결합 및/또는 중양, 세포 증식성 장애 또는 암의 치료 및/또는 예방; 및/또는 FGFR3 발현 및/또는 활성화 (예컨대, 증가된 FGFR3 발현 및/또는 활성화)와 관련된 장애의 치료 또는

예방 중 어느 하나 이상에 대해 특성화된다. 일부 실시양태에서, 항체는 증가된 FGFR3 활성화, 증가된 FGFR3 하류 분자 신호전달, 아폽토시스 활성, FGFR3 하향조절 및 이펙터 기능 (예를 들어, ADCC 활성)에 대해 스크리닝된다.

[0408] 정제된 항체를 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 과파인 소화가 포함되지만 이에 제한되지 않는 일련의 분석법에 의해 추가로 특성화할 수 있다.

[0409] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에서 생산된 항체가 그의 생물학적 활성에 대해 분석된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체가 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다. 당업계에 공지되고 본원에 사용될 수 있는 항원 결합 검정에는 웨스턴 블롯, 방사성면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 사용하는 임의의 직접적 또는 경쟁적 결합 검정이 비제한적으로 포함된다. 예시적 항원 결합 및 다른 검정은 실시예 부분에서 아래 제공된다.

[0410] 세포 성장을 억제하는 항-FGFR3 항체가 바람직하다면, 후보 항체는 세포 성장의 억제를 측정하는 시험관내 및/또는 생체내 검정으로 시험할 수 있다. 아폽토시스를 증진시키거나 또는 증진시키지 않는 항-FGFR3 항체가 바람직하다면, 후보 항체는 아폽토시스를 측정하는 검정으로 시험할 수 있다. 암 세포의 성장 및/또는 증식을 조사하는 방법 또는 암 세포의 아폽토시스를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 일부는 본원에 기재 및 예시되어 있다. 세포 성장 및/또는 증식 및/또는 아폽토시스를 결정하기 위한 예시적 방법은 예를 들어 BrdU 혼입 검정, MTT, $[^3\text{H}]$ -티미딘 혼입 (예를 들어, 탑카운트 검정 (퍼킨엘머)), 세포 생존률 검정 (예를 들어, 셀 타이터-글로 (프로메가)), DNA 단편화 검정, 카스파제 활성화 검정, 트립탄 블루 배제, 크로마틴 형태학 검정 등을 포함한다.

[0411] 한 실시양태에서, 본 발명은 이펙터 기능을 보유하는 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체의 Fc 활성을 측정한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정은 항체가 Fc γ R 결합은 결여되어 있으나 (이에 따라 아마도 ADCC 활성이 결여될 것임), FcRn 결합 능력이 남아있다는 것을 확실하게 하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 조정하는데 중요한 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석법의 예가 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재되어 있다. ADCC 활성을 검출하기 위한 검정은 또한 본원에 예시되어 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 다르게 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가할 수 있다. C1q 결합 검정은 또한 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 이에 따라 CDC 활성이 결여되는 것을 확인하기 위해 수행할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 또한, 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 실시예 단락에 기재된 방법을 사용하여 FcRn 결합 및 생체내 제거율/반감기 측정을 수행할 수 있다.

[0412] 단량체 FGFR3에 결합하는 항-FGFR3 항체가 바람직하다면, 후보 항체는 단량체 FGFR3에 대한 결합 및 단량체 FGFR3의 형성의 증진을 측정하는 검정 (예컨대, 시험관내 검정)으로 시험할 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 알려져 있고, 일부 검정은 본원에 기재되고, 예시되어 있다.

[0413] FGFR3 이량체화를 억제하는 항-FGFR3 항체가 바람직하다면, 후보 항체는 예를 들어 본원에 기재 및 예시된 이량체화 검정으로 시험할 수 있다.

[0414] 일부 실시양태에서, 후보 항체의 FGFR3 효능제 기능을 결정한다. FGFR3 항체의 효능제 기능 또는 활성을 평가하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있고, 일부는 또한 본원에 기재되고, 예시되어 있다.

[0415] 일부 실시양태에서, FGFR3 항체가 FGFR3 수용체 하향조절을 증진시키는 능력은 본원에 기재 및 예시된 방법을 사용하여 결정한다. 한 실시양태에서, FGFR3 항체를 적합한 시험 세포, 예를 들어 방광암 세포주 (예를 들어, RT112)와 인큐베이션하고, 적합한 기간 후에, 세포 용해물을 수확하고, 전체 FGFR3 수준에 대해 조사한다. FACS 분석은 또한 후보 FGFR3 항체와 인큐베이션한 후에 표면 FGFR3 수용체 수준을 조사하는데 사용될 수 있다.

[0416] 백터, 숙주 세포 및 재조합 방법

- [0417] 본 발명의 항체의 제조합 생성을 위해서는, 이를 코딩하는 핵산을 분리시키고, 추가의 클로닝 (DNA 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 사용 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용)하여 쉽게 분리 및 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따른다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포 (일반적으로, 포유동물) 기원 중 하나이다. IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이러한 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 획득될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0418] a. 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:
- [0419] i. 벡터 구축
- [0420] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 제조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 분리되어 서열 결정될 수 있다. 별법으로, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵세포 숙주에서 이중 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 제조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따른 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0421] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마킹(marking) 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라시클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 미국 특허 제5,648,237호 (Carter et al.)에 상세하게 기재되어 있다.
- [0422] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 λ GEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 제조합 벡터의 제조에 이용될 수 있다.
- [0423] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵세포 프로모터는 전형적으로 두 유형의 프로모터, 즉 유도성 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.
- [0424] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 분리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이중 프로모터를 둘 다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.
- [0425] 원핵세포 숙주에 사용하기 적합한 프로모터에는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터가 포함된다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 이들의 뉴클레오타이드 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어답터를 사용하여 이들 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션시킬 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269]).

- [0426] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이중 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식하여 프로세싱하지 않는 원핵 숙주 세포에 대하여, 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA, 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택되는 원핵세포 신호 서열에 의해 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0427] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고, 어셈블리되어, 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 *trx*B-균주)는 디설피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 정확한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다. 문헌 [Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)].
- [0428] 본 발명의 항체의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포에는 원시세균 및 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 박테리아의 예에는 에스케리키아(*Escherichia*) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실러스(*Bacilli*) (예를 들어, 비. 섭틸리스(*B. subtilis*)), 엔테로박테리아, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 시겔라(*Shigella*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*) 또는 파라코쿠스(*Paracoccus*)가 포함된다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (미국 특허 제5,639,635호)을 갖는 균주 33D3을 비롯한, 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체가 포함된다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 특정 유전자형을 갖는 언급된 박테리아의 유도체 중 어느 하나를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410과 같은 잘 알려진 플라스미드를 사용하여 레플리콘을 공급하는 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아, 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.
- [0429] ii. 항체 생성
- [0430] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 필요에 따라 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.
- [0431] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵세포 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.
- [0432] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양 보충물이 추가된 루리아 브로쓰(*Luria broth*; LB)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선별제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.
- [0433] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타민, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트릴 및 디티오트레이톨로 이루어진

균으로부터 선택되는 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

- [0434] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장에 대하여, 바람직한 온도는 예를 들어 약 20℃ 내지 약 39℃, 보다 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 37℃, 보다 더 바람직하게는 약 30℃이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.
- [0435] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당 업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.
- [0436] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막 공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 전형적으로, 단백질 회수는 일반적으로 삼투성 쇼크, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 잔해 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질을 예를 들어 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 별법으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0437] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식(fed-batch) 발효 절차가 재조합 단백질의 생성에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 상기 발효기는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.
- [0438] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당 업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.
- [0439] 본 발명의 폴리펩티드의 생성 수율 및 품질을 향상시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적절한 조립 및 폴딩을 향상시키기 위해, Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 갖는 펩티딜프롤릴 시스,트랜스-이소머라제)와 같은 샤페론 단백질을 과발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Chen et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605]; 미국 특허 제6,083,715호 (Georgiou et al.); 미국 특허 제6,027,888호 (Georgiou et al.); [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al., (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210].
- [0440] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주는 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 이들의 조합물과 같은 공지된 박테리아 프로테아제를 코딩하는 유전자에서 유전자 돌연변이(들)을 달성하도록 변형될 수 있다. 몇몇 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어, [Joly et al., (1998), 상기 문헌]; 미국 특허 제5,264,365호 (Georgiou et al.); 미국 특허 제5,508,192호 (Georgiou et al.); 문헌 [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.
- [0441] 한 실시양태에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 1종 이상의 샤페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.
- [0442] iii. 항체 정제
- [0443] 당 업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화

도 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0444] 한 측면에서, 고체상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전장 항체 생성물의 면역친화도 정제에 사용된다. 단백질 A는 높은 친화도로 항체의 Fc 영역에 결합하는 스태필로코쿠스 아우레아스(*Staphylococcus aureas*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다. (문헌 [Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]). 단백질 A가 고정되는 고체상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼일 수 있다. 일부 용도에서, 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.

[0445] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양액으로부터 유래된 제제를 단백질 A 고정된 고체상에 적용하여 관심있는 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비특이적으로 결합된 오염물을 제거하였다. 최종적으로, 목적하는 항체를 용출에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0446] b. 진행 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0447] 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0448] (i) 신호 서열 성분

[0449] 진행 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심있는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 바람직하게 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 및 또한 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0450] 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임(reading frame)으로 라이게이션된다.

[0451] (ii) 복제 기점

[0452] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 그 이유는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

[0453] (iii) 선별 유전자 성분

[0454] 발현 및 클로닝 벡터는 선별가능한 마커라고도 불리는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 관련이 있는 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0455] 선별 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포들은 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 따라서 선별 계획에서 생존한다. 이러한 우성 선별의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0456] 포유동물 세포에 적합한 선별가능 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 취할 수 있는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0457] 예를 들어, DHFR 선별 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR을 사용할 때의 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0458] 별법으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 또 다른 선별가능 마커, 예컨대 아미노글리코사이드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 공동-형질전환된 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선별가능 마커에 대한 선별제, 예컨대 아미노글리코사이드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418을 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선별될 수 있다. 미국 특허 제4,965,199호를 참조한다.

[0459] (iv) 프로모터 성분

- [0460] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체 폴리펩티드 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵세포 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발점으로부터 70개 내지 80개 염기 상류에 존재하는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 대부분의 진핵세포 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 모든 이러한 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.
- [0461] 포유동물 숙주 세포 내의 벡터로부터의 항체 폴리펩티드 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성일 경우에, 예를 들어 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 유인원 바이러스 40 (SV40)의 게놈으로부터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 열-쇼크 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 조절된다.
- [0462] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득하였다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득하였다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 제4,419,446호에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형은 미국 특허 제4,601,978호에 기재되어 있다. 별법으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체를 프로모터로 사용할 수 있다.
- [0463] (v) 인핸서 요소 성분
- [0464] 고등 진핵세포에 의한 본 발명의 항체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 이것의 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소에 대한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 벡터에서 위치 5' 또는 3'에서 항체 폴리펩티드 코딩 서열로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터부터 부위 5'에 위치한다.
- [0465] (vi) 전사 종결 성분
- [0466] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 보통 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열 또한 함유할 것이다. 상기 서열은 통상적으로 진핵세포 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 절편을 포함한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 이에 개시된 발현 벡터를 참조한다.
- [0467] (vii) 숙주 세포의 선별 및 형질전환
- [0468] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포에는 척추동물 숙주 세포를 비롯하여 본원에 기재된 보다 고등한 진핵세포가 포함된다. 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651), 인간 배아 신장 세포주 (293 세포 또는 현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포 /-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르틀리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.
- [0469] 숙주 세포를 상기 기재된 항체 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양시킨다.

[0470] (viii) 숙주 세포의 배양

[0471] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판 배지, 예컨대 햄(Ham) F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM; 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코(Dulbecco) 개질 이글(Eagle) 배지 (DMEM; 시그마)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0472] (ix) 항체의 정제

[0473] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서 생성되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서 입자형 잔해인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한 외여과에 의해 제거하였다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한 외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 저해하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0474] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는데, 친화도 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중의 하나이다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기초로 한 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 추천된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 공극이 제어된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스보다 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABXTM 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 미국 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)TM에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼)에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

[0475] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심있는 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물로 pH 약 2.5 내지 4.5의 용출 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시할 수 있다.

[0476] 면역접합체

[0477] 또한, 본 발명은 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 본원에 기재된 항-FGFR3 항체 중 어느 하나를 포함하는 면역접합체 (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 언급됨)를 제공한다.

[0478] 세포독성제 또는 세포증식억제제의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체, 즉 암의 치료에서 종양 세포를 사멸 또는 억제시키기 위한 약물 (문헌 [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172]; 미국 특허 제4,975,278호)의 사용은 종양에의 약물 잔기의 표적화된 전달, 및 그 안의 세포내 축적을 가능하도록 하며, 여기서 이러한 비접합된 약물 작용제

의 전신 투여는 정상 세포, 및 제거하고자 하는 종양 세포에 대한 허용되지 않는 수준의 독성을 유발할 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05]; [Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). 이에 의해 최소 독성과 함께 최대 효능이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 둘 다가 이러한 전략에 유용하다고 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87]). 상기 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 ([Rowland et al., (1986) 상기 문헌]). 항체-독소 접합체에 사용되는 독소는 세균 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 겔다나마이신 (문헌 [Mandler et al. (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al., (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al., (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]) 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al., (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 포함하는 메커니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식억제 효과를 나타낼 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우에 불활성이 되거나 활성이 감소되는 경향이 있다.

[0479]

제발린(ZEVALIN)[®] (이브리투모맵 디옥세탄, 바이오젠/이덱(Biogen/Idec))은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 류틴 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성동위원소로 구성된 항체-방사성동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63]; [Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]). 제발린은 B-세포 비호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 마일로타그(MYLOTARG)[™] (젬투주맵 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스(Wyeth Pharmaceuticals)) (칼리케아미신에 연결된 hu CD33 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 2000년에 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 제4,970,198호; 제5,079,233호; 제5,585,089호; 제5,606,040호; 제5,693,762호; 제5,739,116호; 제5,767,285호; 제5,773,001호). 칸투주맵 메르탄신 (이뮤노젠, 인크.(Immunogen, Inc.)) (디술피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 잔기, DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)은 CanAg를 발현하는 암, 예컨대 결장암, 췌장암, 위암 등의 치료를 위해 제II상 임상 시험이 진행되고 있다. MLN-2704 (밀레니엄 팜(Millennium Pharm.)), 비지엘 바이올로지스(BZL Biologics), 이뮤노젠 인크.) (메이탄시노이드 약물 잔기, DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 오리스타틴 펩티드, 오리스타틴 E (AE) 및 모노메틸오리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)은 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종에서의 루이스 Y에 특이적임) 및 cAC10 (혈액 악성종양에서의 CD30에 특이적임)에 접합되었으며 (문헌 [Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784]), 치료학적 개발 하에 있다.

[0480]

면역접합체의 생성에 유용한 화학치료제는 본원에 기재된다 (예를 들어, 상기와 같음). 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다. 방사성접합된 항체의 생성을 위한 다양한 방사선헌종이 이용가능하다. 이것의 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 할소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티

오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO 94/11026을 참조한다.

[0481] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고려된다.

[0482] i. 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0483] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다.

[0484] 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이트누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 제3,896,111호). 이후, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 제4,151,042호). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 제4,137,230호; 제4,248,870호; 제4,256,746호; 제4,260,608호; 제4,265,814호; 제4,294,757호; 제4,307,016호; 제4,308,268호; 제4,308,269호; 제4,309,428호; 제4,313,946호; 제4,315,929호; 제4,317,821호; 제4,322,348호; 제4,331,598호; 제4,361,650호; 제4,364,866호; 제4,424,219호; 제4,450,254호; 제4,362,663호; 및 제4,371,533호에 개시되어 있다.

[0485] 메이탄시노이드 약물 잔기는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디술피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 매력적인 약물 잔기가다.

[0486] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 이들의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 본원에 참고로 명백하게 도입되는 미국 특허 제5,208,020호; 제5,416,064호; 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디술피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 설명하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관 내에서 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0487] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호를 참조한다 (그 개시 내용은 본원에 명백하게 참고로 도입됨). 항체 분자 당 평균 3-4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0488] 예를 들어 개시내용이 본원에 참고로서 명확하게 포함되는 미국 특허 제5,208,020호 또는 유럽 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)] 및 2004년 10월 8일자로 출원된 미국 특허 출원 제10/960,602호에 개시된 것을 비롯하여, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한 다수의 연결기가 당업계에 공지되어 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 2004년 10월 8일자로 출원된 미국 특허 출원 제10/960,602호에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 연결기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디술피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디술피드 및 티오에테르 기가 바람직하다. 추가의 연결기는 본원에 기재되고 예시되어

있다.

- [0489] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 이민노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 디설피드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]), 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.
- [0490] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결부는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.
- [0491] ii. 아우리스타틴 및 돌라스타틴
- [0492] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 오리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 제5,635,483호 및 제5,780,588호). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 제5,663,149호) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 잔기는 펩티드성 약물 잔기의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).
- [0493] 예시적인 오리스타틴 실시양태는, 그의 전체 개시내용이 참조로 명확하게 도입되는 2004년 11월 5일에 출원된 미국 특허 제10/983,340호 (영문 명칭 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸오리스타틴 약물 잔기 DE 및 DF를 포함한다.
- [0494] 전형적으로, 펩티드-기재의 약물 잔기는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합 형성으로 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은, 예를 들어 펩티드 화학 분야에 잘 알려진 액상 합성 방법 (문헌 [E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 오리스타틴/돌라스타틴 약물 잔기는 미국 특허 제5,635,483호; 미국 특허 제5,780,588호; 문헌 [Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al., Synthesis, 1996, 719-725]; 및 [Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863]의 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 그 전문이 본원에 참고로 도입되는 문헌 [Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784]; 2004년 11월 5일자로 출원된 미국 출원 제10/983,340호 (영문 명칭 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands") (예를 들어, 링커 및 링커에 접합된 모노메틸발린 화합물, 예를 들어 MMAE 및 MMAF의 제조 방법을 개시함)을 참조한다.
- [0495] iii. 칼리케아미신
- [0496] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 칼리케아미신 부류의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생성할 수 있다. 칼리케아미신 부류의 접합체를 제조하는 것에 대해서는 미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호 및 제5,877,296호 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니 (American Cyanamid Company)의 특허)를 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내

재화를 통한 이들 작용제의 세포 흡수는 이들의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.

- [0497] iv. 다른 세포독성제
- [0498] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제에는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 제5,053,394호 및 제5,770,710호에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제의 부류, 및 에스페라미신 (미국 특허 제5,877,296호)이 포함된다.
- [0499] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르티디 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232를 참조한다.
- [0500] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.
- [0501] 종양의 선택적 파괴를 위해서, 항체는 높은 방사성의 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성동위원소가 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , 및 Lu의 방사성동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc^{99m} 또는 I^{123} 을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨) 용 스핀 (spin) 표지, 예를 들어 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0502] 방사성- 또는 다른 표지를 공지의 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있고, 또는 예를 들어 수소 대신에 불소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다. tc^{99m} 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 과 같은 표지가 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 요오도겐 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57])을 이용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.
- [0503] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO 94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 제5,208,020호)가 사용될 수 있다.
- [0504] 본 발명의 화합물은 시판하는 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교결합 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.
- [0505] v. 항체 약물 접합체의 제조
- [0506] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)를 통해 항체 당 하나 이상의 약물 잔기 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 잔기에 접합된다. 화학식 I의 ADC는 (1) 항체의 친핵성 기를 2가 링커 시약

과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 잔기 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 잔기의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 방법을 비롯한 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하여 여러 경로에 의해 제조될 수 있다. ADC를 제조하는 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0507] <화학식 I>

[0508] $Ab-(L-D)_p$

[0509] 링커는 하나 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분에는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")가 포함된다. 부가적인 링커 성분이 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에서 기재된다. 또한 그의 전문이 참고로 본원에 도입되는 2004년 11월 5일에 출원된 미국 특허 제10/983,340호 (영문 명칭 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")를 참조한다.

[0510] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드에는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)이 포함된다. 예시적인 트리펩티드에는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연적으로 발생하는 것들 및 소수의 아미노산 및 비천연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양-결합 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 이들의 선택도 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

[0511] 항체 상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민기, (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 항체가 글리코실화되는 당 히드록실기 또는 아미노기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 잔기 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 쇠간 디설피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 환원제, 예컨대 DTT (디티오프레이톨) 처리를 통해 항체를 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵성 기를 형성할 것이다. 리신을 2-이미노티올란 (트라우트 시약)과 반응시켜서 아민을 티올로 전환시킴으로써 추가의 친핵성 기를 항체에 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4 개 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체 내로 도입될 수 있다.

[0512] 본 발명의 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 잔기를 도입하는 항체의 개질에 의해 제조될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당은 예를 들어, 과요오드산염 산화제로 산화시켜, 링커 시약 또는 약물 잔기의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성된 이민 슈프 염기 (Schiff base) 기는 안정적인 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어, 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정적인 아민 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 약물상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤)기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만슨, 바이오컨쥬게이트 테크닉스 (Hermanson, Bioconjugate Techniques)). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; 미국 특허 제5,362,852호). 이러한 알데히드는 약물 잔기 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0513] 유사하게, 약물 잔기 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 포함하는, 링커 잔기 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라이드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴 히드라이드기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

- [0514] 방법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.
- [0515] 또 다른 실시양태에서, 항체는, 항체-수용체 접합체를 개인에게 투여한 후 결합되지 않은 접합체를 제거제를 사용하여 순환으로부터 제거하고 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사선헌종)와 결합되는 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여하는 종양 예비 표적화에 사용하기 위해, "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 결합될 수 있다.
- [0516] 항-FGFR3 항체를 사용하는 방법
- [0517] 본 발명은 FGFR3 항체의 활성으로부터 유리한 효과를 제공하기 위해 의도된 특정 치료 계획의 일부로서 이 치료제의 사용을 특징으로 한다. 본 발명은 다양한 단계에서 다양한 유형의 암을 치료하는데 특히 유용하다.
- [0518] 용어 암은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 전암성 성장, 양성 종양 및 악성 종양을 포함하여 증식성 질환의 총체를 포함한다. 양성 종양은 발원 부위에 국한되어 유지되고 원위 부위로 침윤, 침습, 또는 전이하는 능력을 갖지 않는다. 악성 종양은 그 주변의 다른 조직에 침습하여 손상시킬 것이다. 이는 본래의 부위로부터 갈라져서 신체의 다른 부위로 확산될 수 있는 능력 (전이)을 갖고 있을 수 있는데, 통상적으로 혈류를 통해서이거나 림프절이 위치한 림프계를 통하여 이루어진다. 원발성 종양은 이들이 발생한 조직의 유형에 따라 분류되고, 전이성 종양은 암 세포가 유래된 조직의 유형에 따라 분류된다. 시간이 지남에 따라, 악성 종양 세포는 더욱 비정상적으로 되고 정상 세포와 달라진다. 이러한 암 세포의 외형 상의 변화는 종양 악성도로 지칭되고, 암 세포는 잘 분화된 것 (저 등급), 중간 수준으로 분화된 것, 불량한 수준으로 분화된 것, 또는 분화되지 않은 것 (고 등급)으로서 서술된다. 고분화성 세포는 상당히 정상적인 외형을 나타내며 이들이 유래된 정상 세포와 유사하다. 미분화성 세포는 세포의 기원을 알 수 없을 정도로 매우 비정상적이 된 세포이다.
- [0519] 암의 병기분류 시스템은 암이 해부학적으로 얼마나 멀리 확산되었는지를 기재하고, 동일한 병기 군에서 유사한 예후 및 치료를 나타내는 환자를 수용하고자 하는 것이다. 생검 및 특정 영상화 시험, 예를 들어 흉부 x-선, 유방촬영사진, 골 스캐닝, CT 스캐닝, 및 MRI 스캐닝을 비롯한, 암의 병기분류를 돕기 위한 몇가지 시험을 수행할 수 있다. 또한, 혈액 시험 및 임상 평가를 이용하여 환자의 전반적인 건강 상태를 평가하고 암이 특정 장기로 확산되었는지의 여부를 검출할 수 있다.
- [0520] 암의 병기분류를 위해서, 미국 암 연합 위원회(American Joint Committee on Cancer)는 우선 암, 특히 고형 종양에 TNM 분류 시스템을 이용한 문자 카테고리를 부여한다. 암은 문자 T (종양 크기), N (감지가능한 결절) 및 /또는 M (전이)로 지정된다. T1, T2, T3 및 T4는 원발성 병변의 증가 크기를 기재하고, N0, N1, N2, N3은 점진적으로 진행되는 결절의 존재를 나타내고, M0 및 M1은 원위 전이물의 부재 또는 존재를 반영한다.
- [0521] 전반적인 병기분류 또는 로마 숫자 병기분류라고도 공지된 제2 병기분류 방법에서는 암을 0기 내지 IV기로 나누며, 원발성 병변의 크기 및 또한 결절 확산 및 원위 전이의 존재 여부를 도입한다. 이러한 시스템에서는, 사례를 로마 숫자 I 내지 IV로 표시되는 4가지 병기로 분류하거나 "재발"로서 분류한다. 일부 암의 경우에, 0기는 "계내" 또는 "Tis"라고 지칭되는데, 예를 들어 유방암의 경우에 계내 소엽 암종 또는 계내 관상 암종이다. 고악성도 선종은 또한 0기로 분류될 수도 있다. 일반적으로, I기 암은 통상적으로 치유가능한 작은 국소 암인 반면, IV기 암은 통상적으로 수술이 불가능한 암 또는 전이성 암을 나타낸다. II기 및 III기 암은 통상적으로 국소 진행되고/되거나 국소 림프절의 존재를 나타낸다. 일반적으로, 보다 높은 병기 숫자는 보다 광범위한 질환, 예를 들어 보다 큰 종양 크기 및/또는 원발성 종양에 인접한 근처 림프절 및/또는 장기로의 암의 확산을 표시한다. 이러한 병기는 정확하게 규정되지만, 그 정의는 각 종류의 암마다 상이하고 당업자에게 공지되어 있다.
- [0522] 많은 암 등기소, 예컨대 NCI의 SEER (감독, 역학, 및 최종 결과 프로그램(Surveillance, Epidemiology, and End Results Program))은 요약 병기분류를 이용한다. 이 시스템은 모든 유형의 암에 사용된다. 이는 암 사례를 5가지 주요 카테고리로 분류한다:
- [0523] 계내 암은 암이 시작되는 세포 층에만 존재하는 초기 암이다.
- [0524] 국소 암은 암이 시작되는 장기로 제한되는 암으로, 확산의 증거가 없다.
- [0525] 국부 암은 본래의 (원발성) 부위를 벗어나서 근처 림프절 또는 장기 및 조직으로 확산된 암이다.
- [0526] 원위 암은 원발성 부위로부터 원위 장기 또는 원위 림프절로 확산된 암이다.
- [0527] 미지의 암은 병기 표시에 충분한 정보가 없는 사례를 기재하는데 사용된다.

- [0528] 또한, 원발성 종양이 제거된 지 수 개월 또는 수 년 후에 암이 재발되는 것은 흔한 일이다. 모든 가지적 종양이 근절된 후에 재발되는 암은 재발성 질환이라 불린다. 원발성 종양 부위에서 재발되는 질환은 국소적으로 재발성이고, 전이물로서 재발되는 질환은 원위 재발이라 지칭된다.
- [0529] 종양은 고형 종양 또는 비고형 또는 연조직 종양일 수 있다. 연조직 종양의 예는 백혈병 (예를 들어, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성인 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성숙 B-세포 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 전림프구성 백혈병, 또는 모발상 세포 백혈병) 또는 림프종 (예를 들어, 비호지킨 림프종, 피부 T-세포 림프종, 또는 호지킨병)을 포함한다. 고형 종양은 혈액, 골수 또는 림프계 이외의 신체 조직의 임의의 암을 포함한다. 고형 종양은 상피 세포 기원의 종양 및 비상피 세포 기원의 종양으로 더욱 나눌 수 있다. 상피 세포 고형 종양의 예는 위장관, 결장, 유방, 전립선, 폐, 신장, 간, 췌장, 난소, 두경부, 구강, 위, 십이지장, 소장, 대장, 항문, 담낭, 음순, 비인두, 피부, 자궁, 남성 생식기관, 비뇨기관, 방광, 및 피부의 종양을 포함한다. 비상피 기원의 고형 종양은 육종, 뇌 종양 및 골 종양을 포함한다. 종양의 다른 예는 정의 부분에 기재되어 있다.
- [0530] 일부 실시양태에서, 예를 들어, 요법 전 및/또는 요법 동안 및/또는 요법 후에, 본원에서의 환자가 진단 시험에 적용된다. 일반적으로, 진단 시험이 수행되면, 샘플은 치료를 필요로 하는 환자로부터 얻을 수 있다. 대상체에 암이 존재하는 경우, 샘플은 종양 샘플, 또는 다른 생물학적 샘플, 예를 들어 혈액, 소변, 타액, 복수액, 또는 혈청 및 혈장과 같은 유도체 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 생물학적 유체일 수 있다.
- [0531] 본원에서 생물학적 샘플은 고정된 샘플, 예를 들어 포르말린 고정된, 파라핀-포매 (FFPE) 샘플, 또는 동결된 샘플일 수 있다.
- [0532] mRNA 또는 단백질의 발현을 결정하기 위한 다양한 방법은 유전자 발현 프로파일링, 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 예를 들어 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR), 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석 (SAGE), MassARRAY, 초병렬 시그니처 서열분석 (Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS))에 의한 유전자 발현 분석, 프로테오믹스, 면역조직화학 (IHC) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는 mRNA가 정량된다. 상기 mRNA 분석은 바람직하게는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술을 사용하여, 또는 마이크로어레이 분석에 의해 수행된다. PCR을 사용하는 경우, 바람직한 형태의 PCR은 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)이다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 상기한 유전자의 발현은 예를 들어 동일한 종양 유형의 다른 샘플에 비해 중간값 이상으로 발현될 경우에 양성 발현으로 간주된다. 중간 발현 수준은 본질적으로 유전자 발현의 측정과 동시에 결정될 수 있거나, 또는 사전에 결정될 수 있다.
- [0533] mRNA 단리, 정제, 프라이머 연장 및 증폭을 포함하는, RNA 공급원으로서 고정된 파라핀-포매 조직을 사용하여 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 대표적인 프로토콜의 단계가 발표된 다양한 학회지 논문에 제시되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000)]; [Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)]). 간략하게, 대표적인 방법은 파라핀-포매 종양 조직 샘플을 약 10 마이크로그램 두께의 절편으로 절단하는 것으로 출발한다. 이어서, RNA를 추출하고, 단백질 및 DNA를 제거하였다. RNA의 농도 분석 후에, 필요한 경우 RNA 복구 및/또는 증폭 단계가 포함될 수 있고, RNA는 유전자 특이적 프로모터를 사용하여 역전사되고, 이어서 PCR을 수행한다. 마지막으로, 조사된 종양 샘플에서 확인된 특징적인 유전자 발현 패턴을 기초로 하여 환자에게 이용가능한 최상의 치료 방법(들)을 확인하기 위해 데이터를 분석한다.
- [0534] 유전자 또는 단백질 발현의 검출은 직접적으로 또는 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0535] 암에서의 FGFR3의 발현 또는 전위 또는 증폭을 결정할 수 있다 (직접적으로 또는 간접적으로). 이를 위해, 다양한 진단/예후 검정을 이용할 수 있다. 한 실시양태에서, FGFR3 과다발현은 IHC에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀 포매 조직 절편을 IHC 검정에 적용하고 하기 FGFR3 단백질 염색 강도 기준을 부여할 수 있다.
- [0536] 스코어 0 어떠한 염색도 관찰되지 않거나 막 염색이 10% 미만의 종양 세포에서 관찰된다.
- [0537] 스코어 1+ 희미한/거의 감지할 수 없는 막 염색이 10% 초과 종양 세포에서 검출된다. 세포는 단지 그의 막의 일부에서만 염색된다.
- [0538] 스코어 2+ 약한 수준 내지 중등도의 완전한 막 염색이 10% 초과 종양 세포에서 관찰된다.
- [0539] 스코어 3+ 중등도 내지 강한 수준의 완전한 막 염색이 10% 초과 종양 세포에서 관찰된다.
- [0540] 일부 실시양태에서, FGFR3 과다발현 평가에 대해 0 또는 1+ 스코어를 갖는 종양은 FGFR3을 과다발현하지 않는

것으로 특성화할 수 있는 반면, 2+ 또는 3+ 스코어를 갖는 종양은 FGFR3을 과다발현하는 것으로 특성화할 수 있다.

- [0541] 일부 실시양태에서, FGFR3을 과다발현하는 종양은 세포 당 발현된 FGFR3 분자의 카피의 개수에 상응하는 면역조직화학적 스코어에 의해 등급화될 수 있고, 생화학적으로 결정될 수 있다:
- [0542] 0 = 0-90개 카피/세포,
- [0543] 1+ = 적어도 약 100개 카피/세포,
- [0544] 2+ = 적어도 약 1000개 카피/세포,
- [0545] 3+ = 적어도 약 10,000개 카피/세포.
- [0546] 별법으로 또는 추가로, 종양 내의 FGFR3 증폭 또는 전위의 존재 및/또는 정도 (존재하는 경우)를 결정하기 위해 포르말린-고정, 파라핀-포매 종양 조직에 대해 FISH 검정이 수행될 수 있다.
- [0547] FGFR3 활성화를 직접적으로 (예를 들어, 포스포-ELISA 시험, 또는 인산화된 수용체를 검출하는 또 다른 수단에 의해), 또는 간접적으로 (예를 들어, 활성화된 하류 신호전달 경로 성분의 검출, 수용체 이량체 (예를 들어, 동종이량체, 이종이량체)의 검출, 유전자 프로파일의 검출 등에 의해) 결정할 수 있다.
- [0548] 유사하게, 구성적 FGFR3 및/또는 리간드-비의존성 또는 리간드-의존성 FGFR3은 직접적으로 또는 간접적으로 검출할 수 있다 (예를 들어, 구성적인 활성화와 상관되는 수용체 돌연변이의 검출, 구성적인 활성화와 상관되는 수용체 증폭의 검출 등에 의해).
- [0549] 핵산 돌연변이의 검출 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 종종, 필수적이지는 않지만, 돌연변이가 존재하는지 여부의 결정을 위해 원하는 양의 물질을 제공하도록 샘플 내의 표적 핵산이 증폭된다. 증폭 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 증폭 생성물이 돌연변이가 존재할 것으로 추측되는 특정 아미노산/핵산 서열 위치를 포함하는 한, 증폭 생성물은 관심있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열 전체를 포함하거나 그렇지 않을 수 있다.
- [0550] 한 예에서, 샘플로부터의 핵산을 돌연변이된 핵산을 코딩하는 핵산에 특이적으로 혼성화할 수 있는 핵산 프로브와 접촉시키고, 상기 혼성화를 검출함으로써, 돌연변이의 존재를 결정할 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 방사성동위원소 (^3H , ^{32}P , ^{33}P 등), 형광 작용제 (로다민, 형광물질 등) 또는 발색제로, 프로브가 검출가능하게 표지된다. 일부 실시양태에서, 프로브는 안티센스 올리고머, 예를 들어 PNA, 모르폴리노-포스포로아미데이트, LNA 또는 2'-알콕시알콕시이다. 프로브는 뉴클레오티드 약 8개 내지 뉴클레오티드 약 100개, 또는 약 10개 내지 약 75개, 또는 약 15개 내지 약 50개, 또는 약 20개 내지 약 30개일 수 있다. 또 다른 측면에서, 샘플 내의 FGFR3 돌연변이를 확인하기 위한 키트 내에서 본 발명의 핵산 프로브가 제공하고, 상기 키트는 FGFR3을 코딩하는 핵산 내의 돌연변이 부위 또는 이에 인접한 부위에 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 키트는 FGFR3 돌연변이를 함유하는 종양이 있는 환자를 키트를 사용하는 혼성화 시험의 결과를 기초로 FGFR3 길항제로 치료하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0551] 증폭된 핵산의 전기영동 이동성을 야생형 FGFR3을 코딩하는 상응하는 핵산의 전기영동 이동성과 비교함으로써 돌연변이가 또한 검출될 수 있다. 이동성에서의 차이는 증폭된 핵산 서열 내의 돌연변이의 존재를 가리킨다. 임의의 적합한 분자 분리 기술에 의해, 예를 들어 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동 이동성을 결정할 수 있다.
- [0552] 효소 돌연변이 검출 (EMD: Enzymatic Mutation Detection)을 사용하여 돌연변이의 검출을 위해 핵산을 또한 분석할 수 있다 (문헌 [Del Tito et al., Clinical Chemistry 44:731-739, 1998]). EMD는 박테리오파지 리졸베이스(resolvase) T₄ 엔도뉴클레아제 VII를 사용하고, 이는 점 돌연변이, 삽입 및 결실과 같은 핵산 변경으로부터 초래된 염기쌍 미스매치에 의해 야기되는 구조적 왜곡을 검출하여 절단할 때까지 이중-가닥 DNA를 스캐닝한다. 예를 들어 겔 전기영동에 의한, 리졸베이스 절단에 의해 형성된 2개의 짧은 단편의 검출은 돌연변이의 존재를 가리킨다. EMD 방법의 이점은 증폭 반응으로부터 직접적으로 검정되는 점 돌연변이, 결실 및 삽입을 확인하기 위한 단일 프로토콜이며, 이는 샘플 정제를 필요없게 하고, 혼성화 시간을 단축시키며, 신호-대-잡음 비율을 증가시킨다. 20배 과량까지의 정상 핵산 및 크기가 4 kb 이하인 단편을 함유하는 혼합된 샘플이 검정될 수 있다. 그러나, EMD 스캐닝에서는 돌연변이 양성 샘플에서 발생하는 특정 염기 변화가 확인되지 않고, 따라서 필요하다면 특정 돌연변이를 확인하기 위해 추가적인 서열분석 절차를 종종 요구한다. 미국 특허 제5,869,245

호에 기재된 바와 같이, CEL I 효소가 리졸베이스 T₄ 엔도뉴클레아제 VII와 유사하게 사용될 수 있다.

[0553] 돌연변이를 검출하기 위한 또 다른 간단한 키트는 혈색소증을 야기하는 HFE, TFR2 및 FPN1 유전자에서의 다중 돌연변이를 검출하기 위한 혈색소증 스트립어세이(StripAssay)TM (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>)와 유사한 역-혼성화 시험 스트립이다. 이러한 검정은 PCR에 의한 증폭에 이은 서열 특이적 혼성화를 기초로 한다. 단일 돌연변이 검정을 위해서는 마이크로플레이트-기반 검출 시스템이 적용될 수 있는 반면, 다중 돌연변이 검정을 위해서는 시험 스트립이 "마크로-어레이(macro-array)"로 사용될 수 있다. 키트는 샘플 표본화, 증폭 및 돌연변이 검출을 위한 즉석 사용(ready-to use) 시약을 포함할 수 있다. 멀티플렉스(multiplex) 증폭 프로토콜이 편리를 제공하고, 부피가 매우 제한된 샘플의 시험을 허용한다. 간단한 스트립어세이 양식을 사용하여, 20개 이상의 돌연변이에 대한 시험이 값비싼 장비 없이 5시간 미만으로 완료될 수 있다. 일반적으로 단일 ("멀티플렉스") 증폭 반응에서, 샘플로부터 DNA가 단리되고, 표적 핵산이 시험관 내에서 증폭되고 (예를 들어, PCR에 의해), 비오틴-표지된다. 이후에, 프로브가 평행한 선 또는 밴드로 고정되어 있는 시험 스트립과 같은 고체 지지체 상에 고정된 올리고뉴클레오타이드 프로브 (야생형 및 돌연변이체 특이적)에 증폭 생성물이 선택적으로 혼성화된다. 결합된 비오틴닐화 앰플리콘이 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타제 및 유색 기질을 사용하여 검출된다. 이러한 검정은 본 발명의 돌연변이 모두 또는 그의 임의의 하위세트를 검출할 수 있다. 특정 돌연변이체 프로브 밴드에 관하여, 3가지 신호전달 패턴 중 하나가 가능하다: (i) 정상 핵산 서열을 가리키는 오직 야생형 프로브에만 대한 밴드, (ii) 이형접합 유전자형을 가리키는 야생형 및 돌연변이체 프로브 둘 모두에 대한 밴드, 및 (iii) 동종접합 돌연변이체 유전자형을 가리키는 오직 돌연변이체 프로브에만 대한 밴드. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 증폭 생성물이 리간드를 포함하도록, 샘플로부터 표적 FGFR3 핵산 서열을 단리하고/하거나 증폭시키는 단계, 증폭 생성물을 리간드에 대한 검출가능한 결합 파트너를 포함하고, 본 발명의 돌연변이에 특이적으로 혼성화할 수 있는 프로브와 접촉시키는 단계, 및 이어서 상기 증폭 생성물에 대한 상기 프로브의 혼성화를 검출하는 단계를 포함하는, 본 발명의 돌연변이를 검출하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 리간드는 비오틴이고, 결합 파트너는 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함한다. 한 실시양태에서, 결합 파트너는 스트렙타비딘-알칼리성을 포함하고, 이는 유색 기질로 검출가능하다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 상이한 돌연변이들에 대해 상보적인 프로브들이 서로 분리되어 있는 시험 스트립 상에 프로브가 고정된다. 별법으로, 증폭된 핵산이 방사성동위원소로 표지되고, 이러한 경우 프로브는 검출가능한 표지를 포함할 필요가 없다.

[0554] 야생형 유전자의 변형은 모든 형태의 돌연변이 예컨대 삽입, 역위, 결실 및/또는 점 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 체세포 돌연변이이다. 체세포 돌연변이는 특정 조직, 예를 들어, 종양 조직에서만 발생하는 것이고, 생식계열에서 유전되지 않는다. 생식계열 돌연변이는 모든 신체 조직에서 발견될 수 있다.

[0555] 당업계에 잘 알려져 있고, 종양의 특정 유형 및 위치에 적합한 방법에 의해 표적 핵산을 포함하는 샘플을 수득할 수 있다. 조직 생검은 종양 조직의 대표적인 조각을 얻기 위해 종종 사용된다. 별법으로, 관심있는 종양 세포를 함유하는 것으로 공지되었거나 생각되는 조직/유체의 형태로 종양 세포가 간접적으로 수득될 수 있다. 예를 들어, 폐암 병변의 샘플은 절제, 기관지경 검사, 미세침 흡인, 기관지 찰과술에 의해, 또는 가래, 흉수 또는 혈액으로부터 얻을 수 있다. 돌연변이체 유전자 또는 유전자 생성물을 종양으로부터 또는 다른 신체 샘플 예컨대 소변, 가래 또는 혈청으로부터 수득할 수 있다. 종양 샘플 내의 돌연변이체 표적 유전자 또는 유전자 생성물의 검출에 대해 상기 논의된 것과 동일한 기술을 또 다른 신체 샘플에 적용할 수 있다. 암 세포가 종양으로부터 떨어져 나와 이러한 신체 샘플 내에서 나타난다. 상기 샘플을 스크리닝함으로써, 간단한 조기 진단은 암과 같은 질환에 대해 수행될 수 있다. 또한, 돌연변이체 표적 유전자 또는 유전자 생성물에 대해 이러한 신체 샘플을 시험함으로써 치료법의 진행을 더욱 쉽게 모니터링할 수 있다.

[0556] 종양 세포에 대해 조직 체제를 강화하는 수단이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 조직을 파라핀 또는 동결 절편으로부터 단리할 수 있다. 또한, 암 세포는 유세포 분석법 또는 레이저 포획 미세절제법에 의해 정상 세포로부터 분리될 수도 있다. 이러한 기술, 뿐만 아니라 종양을 정상 세포로부터 분리하기 위한 다른 기술이 당업계에 잘 알려져 있다. 종양 조직이 정상 세포로 고도로 오염된 경우, 돌연변이의 검출이 더욱 어려울 수 있지만, 오염 및/또는 거짓 양성/음성 결과를 최소화하는 방법이 공지되어 있고, 이들 중 일부가 하기에 기재된다. 예를 들어, 관심있는 종양 세포와 관련되지만 상응하는 정상 세포와는 관련되지 않는 것으로 또는 이와 반대인 것으로 공지된 바이오마커 (돌연변이 포함)의 존재에 대해 샘플을 또한 평가할 수 있다.

[0557] 당업계에 주지된 기술을 사용하는 표적 핵산의 분자 클로닝 및 핵산의 서열분석에 의해 표적 핵산 내의 점 돌연변이의 검출이 달성될 수 있다. 별법으로, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)과 같은 증폭 기술을 사용하여 종양 조직

으로부터의 게놈 DNA 표본으로부터 직접적으로 표적 핵산 서열을 증폭시킬 수 있다. 이후에, 증폭된 서열의 핵산 서열을 결정하고, 이로부터 돌연변이를 결정한다. 증폭 기술, 예를 들어, 문헌 [Saiki et al., Science 239:487, 1988]; 미국 특허 제4,683,203호 및 제4,683,195호에 기재된 바와 같은 중합효소 연쇄 반응이 당업계에 잘 알려져 있다.

[0558] 적합한 프라이머의 설계 및 선택이 당업계에 잘 확립되어 있는 기술임을 주지하여야 한다.

[0559] 표적 핵산 서열을 증폭하기 위해서 당업계에 공지되어 있는 리가제 연쇄 반응도 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wu et al., Genomics, Vol. 4, pp. 560-569 (1989)]을 참조한다. 또한, 대립유전자 특이적 PCR로 공지된 기술도 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Ruano and Kidd, Nucleic Acids Research, Vol. 17, p. 8392, 1989]을 참조한다. 이러한 기술에 따라, 그의 3' 말단에서 특정 표적 핵산 돌연변이에 혼성화하는 프라이머들이 사용된다. 특정 돌연변이가 존재하지 않으면, 증폭 생성물이 관찰되지 않는다. 유럽 특허 출원 공개공보 제0332435호, 및 문헌 [Newton et al., Nucleic Acids Research, Vol. 17, p.7, 1989]에 개시된 바와 같은 증폭 불응성 돌연변이 시스템 (ARMS) 또한 사용될 수 있다. 클로닝, 서열분석 및 증폭에 의해 유전자의 삽입 및 결실이 또한 검출될 수 있다. 또한, 유전자 또는 주변의 마커 유전자에 대한 제한 단편 길이 다형성 (RFLP) 프로브를 사용하여 다형성 단편 내의 삽입 또는 대립유전자의 변형을 스코어링할 수 있다. 대립유전자의 염기 변화 변이체를 검출하기 위해 단일 가닥 형태 다형성 (SSCP) 분석이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 86, pp. 2766-2770, 1989], 및 [Genomics, Vol. 5, pp. 874-879, 1989]을 참조한다. 당업계에 공지된 바와 같은 삽입 및 결실을 검출하기 위한 또 다른 기술들이 또한 사용될 수 있다.

[0560] 유전자의 야생형 발현 생성물의 변형을 기초로 야생형 유전자의 변형을 또한 검출할 수 있다. 이러한 발현 생성물에는 mRNA, 뿐만 아니라 단백질 생성물 둘 모두가 포함된다. mRNA를 증폭시키고 서열분석함으로써, 또는 mRNA로부터 제조된 cDNA의 분자 클로닝을 통해 점 돌연변이를 검출할 수 있다. 클로닝된 cDNA의 서열을 당업계에 주지된 DNA 서열분석 기술을 사용하여 결정할 수 있다. 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 통해 cDNA의 서열을 또한 분석할 수 있다.

[0561] 미스매치는 100% 상보성이 아닌, 혼성화된 핵산 듀플렉스이다. 완전한 상보성의 결여는 결실, 삽입, 역위, 치환 또는 프레임이동 돌연변이 때문일 수 있다. 미스매치 검출을 사용하여 표적 핵산 내의 점 돌연변이를 검출할 수 있다. 이러한 기술은 서열분석보다 덜 민감할 수 있지만, 다수의 조직 샘플에 대해 수행하기가 더 간단하다. 미스매치 절단 기술의 예는 RNase 보호 방법이고, 이는 문헌 [Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 7575, 1985] 및 [Meyers et al., Science, Vol. 230, p. 1242, 1985]에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 인간 야생형 표적 핵산에 상보성인 표지된 리보프로브 (riboprobe)의 사용을 수반할 수 있다. 리보프로브 및 조직 샘플로부터 유래된 표적 핵산은 함께 어닐링 (혼성화)된 후, 듀플렉스 RNA 구조에서 일부 미스매치를 검출할 수 있는 효소 RNase A로 소화된다. 미스매치가 RNase A에 의해 검출되면, 이 효소는 미스매치 부위에서 구조를 절단한다. 따라서, 어닐링된 RNA 표본을 전기영동 겔 매트릭스 상에서 분리시킬 때, 미스매치가 RNase A에 의해 검출되어 절단되면, 리보프로브 및 mRNA 또는 DNA에 대해 전장 듀플렉스 RNA보다 작은 RNA 생성물이 관찰될 것이다. 리보프로브는 전장 표적 핵산 mRNA 또는 유전자일 필요가 없고, 돌연변이된 것으로 추측되는 위치를 포함하는 한 표적 핵산의 일부분일 수 있다. 리보프로브가 표적 핵산 mRNA 또는 유전자의 절편만을 포함하는 경우, 원한다면 미스매치에 대해 전체 표적 핵산 서열을 스크리닝하기 위해 다수의 이러한 프로브들을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0562] 유사한 방식으로, 예를 들어 효소적 또는 화학적 절단을 통해 미스매치를 검출하기 위해 DNA 프로브가 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 4397, 1988]; 및 [Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, p. 989, 1975]을 참조한다. 별법으로, 미스매치는 매치된 듀플렉스와 비교할 때 미스매치된 듀플렉스의 전기영동 이동성의 변화에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Cariello, Human Genetics, Vol. 42, p. 726, 1988]을 참조한다. 리보프로브 또는 DNA 프로브로, 돌연변이를 함유할 수 있는 표적 핵산 mRNA 또는 DNA가 혼성화 전에 증폭될 수 있다. 표적 핵산 DNA에서의 변화를, 특히 변화가 전반적인 재배열, 예컨대 결실 및 삽입인 경우, 서던 혼성화를 사용하여 또한 검출할 수 있다.

[0563] 또한, 증폭된 표적 핵산 DNA 서열을 대립유전자-특이적 프로브를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 이러한 프로브는 핵산 올리고머로서, 이들 각각은 공지된 돌연변이를 보유하는 표적 핵산 유전자의 영역을 함유한다. 예를 들어, 한 가지 올리고머는 표적 핵산 서열의 부분에 상응하는, 약 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 이러한 수많은 대립유전자-특이적 프로브를 사용하는 것에 의해, 표적 핵산 증폭 산물을 스크리닝하여 표적 유전자 내

에 종전에 확인된 돌연변이가 존재하는지를 확인할 수 있다. 증폭된 표적 핵산 서열과 대립유전자-특이적 프로브의 혼성화는 예를 들어 나일론 필터 상에서 행할 수 있다. 엄격한 혼성화 조건하에서의 특정 프로브의 혼성화는 종양 조직 내에 대립유전자-특이적 프로브에서와 같은 돌연변이가 존재함을 나타낸다.

[0564] 상응하는 야생형 단백질의 변경에 대해 스크리닝함으로써 야생형 표적 유전자의 변경을 또한 검출할 수 있다. 예를 들어, 표적 유전자 생성물 및 면역반응성인 모노클로날 항체, 예를 들어, 유전자 생성물 (단백질)의 돌연변이된 특정 위치에 결합하는 것으로 공지된 항체를 사용하여 조직을 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 사용되는 항체는 결실된 엑손에 결합하거나 또는 표적 단백질의 결실된 부분을 포함하는 형태 에피토프에 결합하는 항체일 수 있다. 동족 항원의 결합은 돌연변이를 가리킬 것이다. 돌연변이체 대립유전자의 생성물에 특이적인 항체를 또한 사용하여, 돌연변이체 유전자 생성물을 검출할 수 있다. 파지 항체 라이브러리로부터 항체가 확인될 수 있다. 이러한 면역학적 검정은 당업계에 공지된 임의의 편리한 양식으로 수행될 수 있다. 여기에는 웨스턴 블롯, 면역조직화학 검정 및 ELISA 검정이 포함된다. 변경된 단백질을 검출하기 위한 임의의 수단을 사용하여 야생형 표적 유전자의 변경을 검출할 수 있다.

[0565] 프라이머 쌍이 핵산 증폭 기술 예컨대 중합효소 연쇄 반응을 사용하여 표적 핵산의 뉴클레오티드 서열을 결정하는데 유용하다. 단일 가닥 DNA 프라이머들의 쌍이 표적 서열의 증폭을 프라이밍하기 위해 표적 핵산 서열 내의 또는 표적 핵산 서열 주변의 서열에 어닐링될 수 있다. 대립유전자-특이적 프라이머들이 또한 사용될 수 있다. 이러한 프라이머들은 특정 돌연변이체 표적 서열만 어닐링되고, 따라서 주형으로서의 돌연변이체 표적 서열의 존재 하에서만 생성물이 증폭될 것이다. 증폭된 서열의 후속 클로닝을 용이하게 하기 위해, 프라이머의 말단에 제한효소 부위 서열이 부가될 수 있다. 이러한 효소 및 부위는 당업계에 잘 알려져 있다. 당업계에 주지된 기술을 사용하여 프라이머 자체가 합성될 수 있다. 일반적으로, 시판되는 올리고뉴클레오티드 합성 기구를 사용하여 프라이머를 제조할 수 있다. 특정 프라이머의 설계는 충분히 당업계에 기술 내에 속한다.

[0566] 다수의 목적에 핵산 프로브가 유용하다. 이들은 상기에 이미 논의된 점 돌연변이를 검출하기 위한 RNase 보호 방법 및 게놈 DNA에 대한 서던 혼성화에서 사용될 수 있다. 표적 핵산 증폭 생성물을 검출하는데 프로브가 사용될 수 있다. 이들은 또 다른 기술을 사용하여 야생형 유전자 또는 mRNA와의 미스매치를 검출하는데 또한 사용될 수 있다. 효소 (예를 들어, S1 뉴클레아제), 화학물질 (예를 들어, 히드록실아민 또는 4산화오스뮴 및 피페리딘), 또는 전적으로 매칭되는 하이브리드와 비교했을 때 미스매칭된 하이브리드의 전기영동 이동성에서의 변화를 사용하여 미스매치를 검출할 수 있다. 이러한 기술들은 당업계에 공지되어 있다. 문헌 [Novack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, p. 586, 1986]을 참조한다. 일반적으로, 프로브들은 키나제 도메인 외부의 서열에 대해 상보적이다. 전체적인 한 벌의 핵산 프로브가 사용되어, 표적 핵산 내의 돌연변이들을 검출하기 위한 키트를 구성할 수 있다. 이러한 키트는 관심있는 표적 서열의 대형 영역에 대한 혼성화를 허용한다. 프로브들은 서로 중첩될 수 있거나 또는 연속적일 수 있다.

[0567] mRNA와의 미스매치를 검출하기 위해 리보프로브가 사용되는 경우, 이는 일반적으로 표적 유전자의 mRNA에 대해 상보적이다. 따라서 리보프로브는 센스 가닥에 상보적이기 때문에 상응하는 유전자 생성물을 코딩하지 않는다는 점에서 안티센스 프로브이다. 일반적으로 리보프로브는 방사성, 비색성 또는 형광측정성 물질로 표지될 것이고, 이는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. DNA와의 미스매치를 검출하기 위해 리보프로브가 사용되는 경우, 이는 어느 한쪽의 극성, 센스 또는 안티센스일 수 있다. 유사하게, DNA 프로브가 또한 미스매치를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0568] 일부 경우에, 암은 FGFR3을 과다발현하거나 또는 그렇지 않다. 세포 표면 상에 존재하는 수용체 단백질의 증가된 수준을 평가함으로써 (예를 들어, 면역조직화학 검정; IHC를 통해), 진단 또는 예후 검정에서 수용체 과다발현을 결정할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 예를 들어 형광 계내 혼성화 (FISH; W098/45479 (1998년 10월 공개) 참조), 서던 블롯팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예컨대 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해, 세포 내의 수용체-코딩 핵산의 수준을 측정할 수 있다. 상기 분석 이외에도, 당업자라면 다양한 생체내 분석을 이용할 수 있다. 예를 들어, 환자의 신체 내에서 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 세포를 노출시킬 수 있고, 환자에서 세포에 대한 항체의 결합은, 예를 들어 방사선용 스캐닝 또는 이전에 항체에 노출된 환자로부터 수득한 생검의 분석에 의해 평가할 수 있다.

[0569] 화학요법제

[0570] 본 발명의 조합 요법은 하나 이상의 화학요법제(들)를 더욱 포함할 수 있다. 병용 투여에는 별개의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하여 공동-투여 또는 동시에 투여하는 것과, 어느 한 순서로 연속적으로 투여하는 것이 포함되는데, 바람직하게는 양 (또는 모든) 활성제가 그의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 기간이 있다.

- [0571] 화학요법제는 투여할 경우, 이에 대해 공지된 투여량으로 통상 투여하거나, 또는 임의로는 약물의 복합 작용 또는 항대사제 화학요법제의 투여에 기인한 음성 부작용 때문에 투여량을 감소시켜 투여한다. 이러한 화학요법제에 대한 제조 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 전문인이 경험적으로 결정하는 바에 따라 이용될 수 있다.
- [0572] 조합될 수 있는 다양한 화학요법제는 본원에 개시되어 있다.
- [0573] 일부 실시양태에서, 조합되는 화학요법제는 레날리도미드 (레블리미드), 프로테오솜 억제제 (예컨대 보르테조미프 (벨케이드) 및 PS342), 보라 탁소이드 (도세탁셀 및 파클리탁셀 포함), 빈카 (예컨대 비노렐빈 또는 빈블라스틴), 백금 화합물 (예컨대 카르보플라틴 또는 시스플라틴), 아로마타제 억제제 (예컨대 레트로졸, 아나스트라졸, 또는 엑세메스테인), 항-에스트로겐 (예를 들어, 퓌베스트란트 또는 타목시펜), 에토포시드, 티오테파, 시클로포스파미드, 페메트렉세드, 메토티렉세이트, 리포솜 독소루비신, PEG화 리포솜 독소루비신, 카페시타빈, 겐시타빈, 멜탈린, 독소루비신, 빈크리스틴, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레코시브) 또는 스테로이드 (예를 들어, 텍사메타손 및 프레드니손)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서 (예를 들어, t(4;14)+ 다발성 골수종의 치료와 연관된 실시양태), 텍사메타손과 레날리도미드, 또는 텍사메타손, 또는 보르테조미프, 또는 빈크리스틴, 독소루비신과 텍사메타손, 또는 탈리도미드와 텍사메타손, 또는 리포솜 독소루비신, 빈크리스틴과 텍사메타손, 또는 레날리도미드와 텍사메타손, 또는 보르테조미프와 텍사메타손, 또는 보르테조미프, 독소루비신과 텍사메타손이 조합된다. 일부 실시양태에서 (예를 들어, 방광암과 관련된 실시양태), 겐시타빈과 시스플라틴, 또는 탁산 (예를 들어, 파클리탁셀, 도세탁셀), 또는 페메트렉세드, 또는 메토티렉세이트, 빈블라스틴, 독소루비신과 시스플라틴, 또는 카르보플라틴, 또는 5-플루오로우라실과 조합된 미토마이신 C, 또는 시스플라틴, 또는 시스플라틴과 5-플루오로우라실이 조합된다.
- [0574] 제제, 투여량 및 투여
- [0575] 본 발명에서 사용된 치료제는 양호한 의료 관행과 일치하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여된다. 본 명세서에서 고려되는 인자는 치료되어질 특정한 질환, 치료되어질 특정한 대상체, 개별 환자의 임상 조건, 질환의 원인, 약제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 조합되는 약제의 약물-약물 상호작용, 및 개업 의사에게 공지된 다른 인자를 포함한다.
- [0576] 치료 제제는 목적하는 순도를 지닌 활성 성분을 임의의 생리상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 당해 분야에 공지된 표준 방법을 이용하여 제조한다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]). 허용되는 담체는 염수, 또는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 향산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라진, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 당알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 PEG를 포함한다.
- [0577] 임의로, 그러나 바람직하게는, 제형은 제약상 허용되는 염, 바람직하게는 염화나트륨을 함유하고, 바람직하게는 이는 대략적으로 생리학적 농도이다. 임의로, 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 보존제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보존제 농도는 0.1 내지 2.0% (전형적으로는 v/v)의 범위이다. 적합한 보존제는 제약 업계에 공지된 것을 포함한다. 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, 메틸파라벤 및 프로필파라벤이 바람직한 보존제이다. 임의로, 본 발명의 제제는 0.005 내지 0.02% 농도의 제약상 허용되는 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0578] 본원에서의 제제는 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.
- [0579] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로소피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 매크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌]에 개시되어 있다.

- [0580] 서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우, 37℃에서 습도에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 수반된 메커니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 응집 메커니즘이 티오-디설피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술프하이드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.
- [0581] 본 발명의 치료제는 공지된 방법에 따라서, 예컨대 볼루스로서 정맥내 투여에 의해 또는 장기간에 걸친 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액막내, 경막내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 연속 주입에 의해 인간 환자에게 투여된다. 치료 용도에 생체의 전략을 사용할 수도 있다. 생체외 전략은 대상체로부터 수득된 세포를 FGFR3 길항제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 형질감염 또는 형질도입시키는 것을 포함한다. 이어서, 상기 형질감염 또는 형질도입된 세포를 대상체에게 다시 주입한다. 세포는 조혈 세포 (예를 들어, 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포 또는 B 세포), 섬유모세포, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포 또는 근육 세포를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아닌 임의의 광범위한 범위의 유형일 수 있다.
- [0582] 예를 들어, FGFR3 길항제가 항체인 경우, 이러한 항체는 임의의 적합한 수단, 예를 들어 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국소 면역억제제 처치를 위해 원한다면 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 추가로, 항체는 특히 항체의 용량을 감소시킨 펄스 주입에 의해 적합하게 투여된다. 바람직하게는, 투여는 부분적으로는 투여가 단기인지 장기인지에 따라 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 제공된다.
- [0583] 또 다른 예에서, FGFR3 길항제 화합물은 예를 들어 장애 또는 종양의 위치가 허용된다면 직접 주사에 의해 국소 투여되고, 상기 주사는 주기적으로 반복될 수 있다. FGFR3 길항제는 또한 국소 재발 또는 전이를 예방하거나 감소시키기 위해서 종양의 수술적 절제 이후에 대상체에게 전신 전달될 수도 있고, 또는 종양 세포에, 예를 들어 종양 또는 종양 층에 직접 전달될 수도 있다.
- [0584] 치료제들의 조합 투여는 전형적으로 한정된 기간에 걸쳐 수행된다 (보통, 선택된 조합에 의존하여 수 분, 수 시간, 수 일 또는 수 주일). 조합 요법은 연속적인 방식으로 치료제를 투여하는 것, 즉 각각의 치료제를 상이한 시간에 투여하는 것뿐만 아니라 치료제들 또는 적어도 2가지 치료제를 실질적으로 동시에 투여하는 것을 포함하는 것으로 해석된다.
- [0585] 치료제는 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합된 항-FGFR3 항체를 정맥내 주사에 의해 투여할 수도 있는 반면, 조합된 화학요법제를 경구 투여할 수도 있다. 별법으로, 예를 들어, 특정 치료제에 따라, 치료제들 둘 모두가 경구 투여될 수 있거나, 또는 두 치료제가 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 치료제를 투여하는 순서도 또한 특정한 약제에 의존하여 변한다.
- [0586] 질환의 유형 및 중증도에 의존하여, 예를 들어 1회 이상의 분할 투여에 의해 투여하든지 또는 연속 주입에 의해 투여하든지, 각각의 치료제의 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 이 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 용량이다. 상기 언급된 요인에 따라, 전형적인 1일 투여량은 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수 일 이상에 걸친 반복 투여를 위하여, 상태에 따라 상기 기재된 방법에 의해 측정 시에 암이 치료될 때까지 치료를 지속한다. 그러나, 다른 투약법이 유용할 수 있다.
- [0587] 본 출원은 유전자 요법에 의한 FGFR3 항체의 투여를 고려한다. 세포내 항체를 생성하기 위한 유전자 요법의 사용에 관해서는 예를 들어, 1996년 3월 14일자로 공개된 W096/07321을 참조한다.
- [0588] 제조품
- [0589] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 언급된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이

제공된다. 제조품은 용기, 및 용기상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는, 단독으로 또는 다른 조성물(들)과 조합하여 질환을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 조성물을 보유하며, 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 봉지 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 선택된 상태, 예컨대 암의 치료에 사용된다는 것을 표시한다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (이 조성물은 본 발명의 항체를 포함한다); 및 (b) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제2 용기 (이 조성물은 추가의 세포독성제를 포함한다)를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서의 제조품은, 제1 및 제2 항체 조성물이 특정 질환 (예를 들어, 암)을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 제조품은 또한 제약상-허용되는 완충제, 예컨대 주사용 정균수 (BWF1), 인산염-완충 식염수, 링거액 (Ringer's solution) 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

[0590] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기 제시된 일반적인 설명을 기초로 하여 다양한 다른 실시양태를 실시할 수 있음이 이해된다.

[0591] 실시예

[0592] 물질 및 방법

[0593] 세포주 및 세포 배양

[0594] 세포주 RT4는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션으로부터 수득하였다. 세포주 RT112, OPM2 및 Ba/F3는 미생물 및 세포 배양물의 독일 컬렉션 (DSMZ, (독일))으로부터 구입하였다. 다발성 골수종 세포주 KMS11은 가와사키 (Kawasaki) 의과 대학 (일본)의 다케미 오즈키(Takemi Otsuki) 박사가 친절하게 제공해 주었다. 방광암 세포주 TCC-97-7은 세인트 제임스 대학 병원 (영국 리즈)의 마가렛 놀스(Margaret Knowles) 박사의 관대한 선물이었다. UMUC-14 세포주는 H.B. 그로스만(Grossman) 박사 (현재 텍사스 대학 M.D. 앤더슨(Anderson) 암 센터 (텍사스))로부터 수득하였다. 세포를 37°C에서 5% CO₂의 조건하에 10% 태아 소 혈청 (FBS) (시그마), 100 U/ml 페니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신 및 L-글루타민이 보충된 RPMI 배지로 유지시켰다.

[0595] FGFR3^{S249C} 이량체화 연구

[0596] UMUC-14 세포를 시스테인-비함유 배지에서 성장시키고, R3Mab 또는 DTNB로 3시간 동안 처리하고, 세포 용해물을 환원 또는 비-환원 조건하에 이뮤노블롯 분석하였다. 시험관내 이량체화 연구의 경우, FGFR3-II1b^{S249C} (잔기 143-374)를 pAcGP67A 벡터에 클로닝하고, T.ni Pro 세포에서 발현시켰다. 제조합 단백질을 Ni-NTA 칼럼에 이어 슈퍼덱스(Superdex) S200 칼럼을 통해 정제하였다. 이량체 FGFR3^{S249C}를 25 mM Tris (pH 7.5) 및 300 mM NaCl에서 용출하였다. R3Mab (1 μM)를 37°C에서 하기 조건하에 FGFR3^{S249C} 이량체 (0.1 μM)와 인큐베이션하였다: 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.5), 25 μM DTT, 1 mM EDTA 및 0.75 mg/ml BSA. 반응물의 분취액을 지시된 시점에 취하고, β-메르캅토에탄올이 없는 샘플 완충제를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이량체-단량체를 이뮤노블롯에 의해 분석하였다.

[0597] 이종이식편 연구

[0598] 모든 연구는 제넨테크의 동물 관리 및 사용 윤리 위원회의 승인을 받았다. 암컷 nu/nu 마우스 또는 CB17 중증 복합 면역결핍 (SCID) 마우스 (6 내지 8주령)를 찰스 리버 래보러토리 (미국 캘리포니아주 홀리스트)로부터 구입하였다. 암컷 무흉선 누드 마우스를 국립 암 연구소-프레더릭(Frederick) 암 센터로부터 수득하였다. 마우스를 특정 병원체-비함유 조건하에 유지시켰다. RT112 shRNA 안정한 세포 (7 x 10⁶개), RT112 (7 x 10⁶개), Ba/F3-FGFR3^{S249C} (5 x 10⁶개), OPM2 (15 x 10⁶개) 또는 KMS11 세포 (20 x 10⁶개)를 HBSS/매트리젤 (1:1 v/v, BD 바이오사이언시즈) 중 0.2 ml의 부피로 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. UMUC-14 세포 (5 x 10⁶개)를 매트리지 없이 이식하였다. 종양을 매주 2회 캘리퍼를 사용하여 측정하고, 종양 부피를 식: V=0.5 a x b² (여기서,

a 및 b는 각각 종양의 길 및 폭(임)을 사용하여 계산하였다. 평균 종양 부피가 $150-200 \text{ mm}^3$ 에 도달하였을 때, 마우스를 10개의 군으로 임의로 추출하고, 매주 2회 R3Mab (0.3-50 mg/kg)의 복강내 (i.p) 주사 또는 HBSS에 희석시킨 대조군 인간 IgG1로 처리하였다. 대조군 동물에게 비히클 (HBSS)을 단독으로 제공하였다.

[0599]

통계

[0600]

모든 데이터를 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. 언페어드 스튜던츠 t 시험 (2-테일드)을 사용하여 두 군 사이를 비교하였다. $P < 0.05$ 의 값은 모든 실험에서 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0601]

FGFR3 shRNA 안정한 세포의 생성

[0602]

3개의 독립적인 FGFR3 shRNA를 기재된 바와 같이 (1), pHUSH 벡터에 클로닝하였다. 연구에 사용된 FGFR3 shRNA에 대한 서열은 다음과 같다:

shRNA2:

5'GATCCCCGCATCAAGCTGCGGCATCATTCAAGAGATGATGCCGCAGCTTGATGCTT

TTTTGGAAA (서열 192); shRNA4: 5'-GATCCCCTGCACAACCTCGACTACTA

TTCAAGAGATAGTAGTCGAGGTTGTGCATTTTTTGGAAA-3' (서열 193);

shRNA6: 5'-

GATCCCCAACCTCGACTACTACAAGATTCAAGAGATCTTGTAGTAGTCGAGGTTTTTTT

TTGGAAA-3' (서열 194)

[0603]

[0604]

모든 구축물을 서열분석에 의해 확인하였다. EGFP 대조군 shRNA는 본 발명자들의 이전의 연구에 기재되어 있다 (50). GP2-293 패키징 세포 (클론테크 래보러토리즈(Clontech Laboratories), 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)를 VSV-G (클론테크 래보러토리즈) 및 pHUSH-FGFR3 shRNA 구축물로 동시-형질감염시켜 shRNA 함유 레트로바이러스를 생성하고, 형질감염 72시간후 바이러스 상청액을 수확하고, 형질도입 실험을 위해 원심분리에 의해 세포 잔해물을 정화하였다.

[0605]

RT112 세포를 테트라시클린-비함유 FBS (클론테크 래보러토리즈)를 함유하는 RPMI 1640 배지에 유지시키고, $4 \mu\text{g/ml}$ 폴리브렌의 존재하에 레트로바이러스 상청액으로 형질도입시켰다. 감염 72시간 후에, $2 \mu\text{g/ml}$ 퓨로마이신 (클론테크 래보러토리즈)을 배지에 첨가하여 shRNA를 발현하는 안정한 클론을 선별하였다. 안정한 세포를 단리하고, 0.1 또는 $1 \mu\text{g/ml}$ 독시시클린 (클론테크 래보러토리즈)으로 4일 동안 처리하고, FGFR3 단백질 발현의 유도가능한 억다운을 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 평가하였다. 세포 주기 분석을 기재된 바와 같이 수행하였다 (51).

[0606]

FGFR3에 특이적인 파지 항체의 선별

[0607]

인간 IgG 레퍼토리의 천연 다양성을 모방한, 선별된 상보성 결정 영역 (H1, H2, H3, L3)에서 합성적 다양성을 갖는 인간 파지 항체 라이브러리를 패닝에 사용하였다. Fab 단편을 M13 박테리오파지 입자의 표면 상에 2가 디스플레이하였다 (52). 인간 FGFR3-IIIb 및 IIIc의 His-태그 부착된 IgD2-D3을 항원으로 사용하였다. 96-웰 맥시소르프(MaxiSorp) 이뮤노플레이트 (넉(Nunc))를 밤새 4°C 에서 FGFR3-IIIb-His 단백질 또는 FGFR3-IIIC-His 단백질 ($10 \mu\text{g/ml}$)로 코팅하고, 1% BSA가 보충된 PBST 완충제 (PBS + 0.05% 트윈 20)로 1시간 동안 차단하였다. 항체 파지 라이브러리를 첨가하고, 실온 (RT)에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST 완충제로 세척하고, 결합된 파지를 30분 동안 50 mM HCl 및 500 mM NaCl로 용출하고, 동일 부피의 1 M Tris 염기로 중화시켰다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포에서 증폭시켰다. 이후의 선별 라운드 동안, 파지 항체의 인큐베이션 시간을 2시간으로 줄이고, 플레이트 세척의 엄격도를 점차 증가시켰다 (53). FGFR3의 IIIb 및 IIIc 이소형 둘 모두에 결합하는 유일하고 특이적인 파지 항체를 파지 ELISA 및 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 스크리닝된 400개 클론 중에서 4개를 선별하여, 각각 개별 클론의 VL 및 VH 영역의 LPG3 및 LPG4 벡터로의 클로닝에 의해 전장 IgG로 다시 포맷하고, 포유동물 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 칼럼으로 정제하였다 (54). 친화도 성숙을 위해 클론 184.6을 선별하였다.

[0608]

친화도 성숙을 위해, M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이하는 파지미드 (52)를 파지 Ab의 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) 가변 도메인 이식을 위한 라이브러리 주형으로 제공하였다. 정지 코돈을 CDR-L3에 혼입시켰다. 기재된 바와 같이 가벼운 임의 추출 전략을 친화도 성숙을 위해 채택하였다 (53). CDR 루프의 2가지 상이한 조합, H1/H2/L3, H3/L3 또는 L1/L2/L3을 임의 추출을 위해 선별하였다. 친화도 성숙 클론을 선별하기 위해, 파지 라이브러리를 FGFR3 IIIb 또는 IIIc-His 단백질에 대해 분류하였으며, 기재된 바와 같이 제1 라운드로 플

레이트 분류를 적용한 후에 4개 라운드의 용액 상 분류를 적용하였다 (52). 5개 라운드의 패닝 후에, 고-처리량 단일-지점 경쟁 파지 ELISA를 사용하여 기재된 바와 같이 고-친화도 클론에 대해 빠르게 스크리닝하였다 (55). FGFR3-His의 부재하의 450 nm에서의 흡광도에 대한 10 nM FGFR3-His의 존재하의 450 nm에서의 흡광도의 작은 비율을 갖는 클론을 추가의 특성화를 위해 선택하였다.

[0609] 클론 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 및 184.6.92는 Ba/F3-FGFR3-IIIb, Ba/F3-FGFR3-IIIc 및 Ba/F3-FGFR3-S249C 세포주의 생존률을 유의하게 감소시켰으려, 클론 184.6.52는 Ba/F3-FGFR3-S249C 세포주의 생존률을 유의하게 감소시켰다. 검정된 세포주에 따라 증가된 억제 활성은 부모 클론 184.6보다 약 50배 (클론 184.6.52) 내지 약 100배 (클론 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 및 184.6.92) 더 높은 범위였다. FGFR3-IIIb 및 FGFR3-IIIc에 대한 클론 184.6.1, 184.6.58 및 184.6.62의 결합 동역학을 다음과 같이 비아코어를 사용하여 결정하였다:

	FGFR3-IIIb KD (M)	FGFR3-IIIc KD (M)
184.6	3.80E-08	1.10E-07
184.6.1	2.64E-10	1.44E-09
184.6.58	1.90E-10	8.80E-10
184.6.62	1.20E-10	2.24E-09

[0610]

[0611] 클론 184.6.1, 184.6.58 및 184.6.62는 또한 Ba/F3-FGFR3 세포, RT112 세포 및 OPM2 세포에서 FGFR3 하류 신호 전달의 개선된 억제를 보여주었다.

[0612] 클론 184.6.1을 선별하였다. 서열 변형, N54S를 잔기 54에서 HVR H2에 도입하여 제조가능성을 개선시켜, 클론 184.6.1N54S를 생성하였다. 클론 184.6.1 및 184.6.1N54S는 Ba/F3 세포 생존률 검정에서 대등한 결합 동역학 (비아코어 검정에서 측정) 및 대등한 활성을 나타내었다. 추가의 HVR H2 변이체를 생성하였다: N54S를 클론 184.6.58에 도입하고, N54G, N54A 또는 N54Q를 클론 184.6.1 및 184.6.58에 도입하였다. 이들 클론은 Ba/F3 세포 생존률 검정에서 부모 클론 184.6.1 또는 184.6.58에 대등한 활성을 나타내었다.

[0613] 또 다른 서열 변형, D30E를 클론 184.6.1N54S의 HVR L1에 도입하여 클론 184.6.1NSD30E를 생성하였다. 클론 184.6.1NSD30E 및 클론 184.6.1N54S는 BA/F3 세포 생존률 검정에서 부모 클론 184.6.1 또는 184.6.58에 대등한 결합 동역학 및 대등한 활성을 나타내었다.

[0614] 본원에 사용된 "R3 Mab"는 항-FGFR3 항체 클론 184.6.1N54S, 184.6.1 또는 184.6을 나타낸다. 하기 도면 (이에 사용된 항체를 괄호 안에 나타냄): 도 9B (클론 184.6.1), 10 (클론 184.6), 11A 및 B (클론 184.6), 13 (클론 184.6.1), 14A (클론 184.6.1), 14B, G 및 H (클론 184.6), 19 (클론 184.6.1), 및 22B 및 C (클론 184.6.1)에 나타낸 결과를 나타내는 실험을 제외하고, 클론 184.6.1N54S를 "R3Mab"로 언급하여 도면 및 실험에 사용하였다.

[0615] 항체 결합 친화도 결정을 위한 비아코어/표면 플라즈몬 공명 (SRP) 분석

[0616] FGFR3에 대한 R3Mab의 결합 친화도를 기재된 바에 따라 (52), 하기와 같이 변형시켜 비아코어™-3000 기기를 사용하는 비아코어/SRP에 의해 측정하였다. R3Mab를 CM5 바이오센서 칩 상에 직접 코팅하여 대략 400 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 동역학 측정을 위해, FGFR3-IIIb 또는 IIIc-His 단백질의 2배 연속 희석액 (67 nM으로부터 출발)을 30 μ l/분의 유속으로 25°C에서 PBST 완충제에 주입하였다. 결합 속도 (K_{on} , mol/s 당) 및 해리 속도 (K_{off} , s 당)를 단순 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_d , mol 당)를 K_{off}/K_{on} 의 비율로 계산하였다.

[0617] FGFR3에 대한 마우스 하이브리도마 항체의 결합 친화도를 하기와 같이 비아코어/SRP에 의해 측정하였다. 인간 FGFR3-IIIb 또는 IIIc를 비아코어™ CM5 센서 칩의 3가지 상이한 유동 세포 (FC), FC2, FC3 및 FC4 상에 커플링시켜 반응 단위 (RU) 약 50 RU를 달성하였다. 제조업자에 의해 제공된 프로토콜을 사용하여 아미노기를 통한 무작위적인 커플링에 의해 고정화를 달성하였다. 30 μ l/분의 유속에서 2배 증분의 250 nM 내지 0.48 nM 범위의 일련의 용액의 주입에 의한 25°C에서의 하이브리도마-유래 항-FGFR3 무린 IgG 또는 Fab 단편의 이들 표면에 대한 결합에 대해 센소그램을 기록하였다. 각각의 주입 사이에, 10 mM 글리신-HCl (pH 1.7)을 완충제로 제공하여 센서 칩을 재생시켰다. 참조 세포 (FC1)로부터의 신호를 FC2, FC3 및 FC4에서 관찰된 센소그램에서 감하였다.

제조업자에 의해 공급된 비아코어 평가 소프트웨어 (버전 3.2)를 사용하여 1:1 랭뮤어 결합 모델에 따른 데이터의 비선형 회귀 핏팅에 의해 동역학 상수를 계산하였다.

[0618] ELISA 결합 연구

[0619] 인간 FGFR1-IIIb, IIIc, FGFR2-IIIb 및 IIIc, FGFR3-IIIb 및 IIIc, 및 FGFR4의 세포외 도메인 (ECD)을 코딩하는 cDNA를 pRK-기제 벡터에 클로닝하여 인간 FGFR-인간 Fc 키메라 단백질을 생성하였다. 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포를 일시적으로 형질감염시켜 재조합 단백질을 생성하고, 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 인간 FGFR에 대한 항체의 결합을 시험하기 위해, 맥시소프 96-웰 플레이트 (네크)를 밤새 4℃에서 50 μ l의 2 μ g/ml FGFR ECD-인간 Fc 키메라 단백질로 코팅하였다. 포스페이트-완충 염수 (PBS)/3% BSA로 차단한 후에, FGFR3 항체를 첨가하고, RT에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 특이적으로 결합된 FGFR3 항체를 HRP-접합된 항-인간 Fab 및 TMB 퍼옥시다제 발색 기질 (KPL, 미국 매릴랜드주 개이더스버그)을 사용하여 검출하였다.

[0620] FGFR3에 대한 항체의 FGF/FGFR3 상호작용에 대한 효과를 시험하기 위해, FGFR3-Fc 키메라 단백질을 항-인간 이뮤노글로불린 Fc γ 단편-특이적 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch), 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브)로 코팅된 맥시소프 플레이트 상에 포획하였다. 세척 후에, 증가하는 양의 FGFR3 항체를 플레이트에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, FGF1 또는 FGF9 및 헤파린을 첨가하여 RT에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 비오틴화된 FGF1-특이적 폴리클로날 항체 (BAF232) 또는 비오틴화된 FGF9 항체 (BAF273, R&D 시스템즈(R&D Systems))와 1시간 동안 인큐베이션한 후에 스트렙타비딘-HRP 및 TMB로 검출하였다.

[0621] Ba/F3-FGFR3 안정한 세포의 생성

[0622] 전장 인간 FGFR3 IIIb 또는 IIIc를 코딩하는 cDNA를 pQCXIP 벡터 (클론테그 래보러토리즈, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)에 클로닝하여 pQCXIP-FGFR3-IIIb 또는 IIIc를 생성하였다. 특이적 돌연변이, 즉 R248C, S249C, G372C, Y375C 및 K652E를 퀵체인지(QuickChange) (스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 줄라)를 통해 cDNA에 도입하였다. 야생형 또는 돌연변이체 FGFR3을 발현하는 Ba/F3 안정한 세포를 생성하기 위해, 다양한 pQCXIP-FGFR3 구축물을 패키징 세포 GP2-293에 VSV-G 플라스미드 (클론테크 래보러토리즈)와 동시-형질감염시켰다. 2주 동안 2 μ g/ml 푸로마이신으로 선별한 후에, 야생형 또는 돌연변이체 FGFR3을 발현하는 세포를 피코에리트린-접합된 항-인간 FGFR3 mAb (FAB766P, R&D 시스템즈)로 염색하고, 기능 검정을 위한 형광-활성화 세포 분류 (FACS)를 통해 선별하였다. 96-웰 마이크로-타이터 플레이트에서의 세포 증식 검증을 위해, 하기 세포 농도를 사용하였다: 야생형 FGFR3-IIIb 및 FGFR3-K652E를 발현하는 세포의 경우: 5,000개 세포/웰; 나머지: 10,000개 세포/웰. 세포를 10% 태아 소 혈청, 10 ng/ml FGF1 + 10 μ g/ml 헤파린 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트 루이스)이 보충된 RPMI 1640 배지에 시딩하였다. R3Mab를 지시된 농도에서 첨가하고, 마우스 하이브리도마 FGFR3 항체는 FGFR3-IIIb 실험에서 2000 내지 0.49 ng/ml (4배 연속 희석)로 첨가하고, FGFR3-IIIc 실험에서 5000 내지 1.2 ng/ml (4배 연속 희석)로 첨가하였다. 72시간 동안 인큐베이션한 후에, 세포 생존율을 셀타이터-글로 (프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨)로 평가하였다.

[0623] 세포 증식 검정

[0624] RT112, RT4 및 TCC-97-7 세포에 대한 증식 검정을 위해, 3000개 세포 /웰을 96-웰 마이크로-타이터 플레이트에 시딩하고, 밤새 부착시켰다. 이어서, 배지를 지시된 농도의 대조군 또는 R3Mab를 포함하는 낮은 혈청 배지 (0.5% FBS)로 교체하였다. 4일 인큐베이션 후에, 1 μ Ci의 [메틸-³H]티미딘 (퍼킨엘머, 미국 매사추세츠주 윌섬)을 각각의 웰에 첨가하고, 추가의 16시간 동안 인큐베이션하였다. 팩커드 필터메이트(Packard Filtermate) 수확기를 사용하여 유니필터(UniFilter)로 세포를 옮기고, 성장하는 세포의 게놈 DNA에 혼입된 [³H]-티미딘을 탑카운트(TopCount) (퍼킨엘머)를 사용하여 측정하였다. 일부 경우에, 항체와 4일 동안 인큐베이션한 후에 세포 생존율을 셀타이터-글로 (프로메가)로 평가하였다. 값을 4개조의 평균 +/- SE로 나타내었다.

[0625] 클론 성장 검정

[0626] 세포 클론원성(clonogenicity)에 대한 R3Mab의 효과를 이전에 기재된 프로토콜에 따라 평가하였다 (50). 간략하게, 400 UMC-14 세포를 10% 태아 소 혈청이 보충된 DMEM 배지 중 6-웰 플레이트에 시딩하고, 밤새 부착시켰다. 이어서, 0.1% BSA 배지에 희석시킨 R3Mab 또는 대조군 항체를 10 μ g/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 동일 부피의 0.1% BSA 배지 단독 (Mock)을 또 다른 대조군으로 사용하였다. 대조군의 세포가 충분히 많은 콜로니를

형성할 때까지 세포를 약 12일 동안 인큐베이션하였다. 콜로니를 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 콜로니의 개수 및 크기를 겔카운트(GelCount) (영국 옥스포드)를 사용하여 정량하였다. 직경이 120 μ m보다 큰 콜로니의 개수를 평균 $\pm$ SEM (n=12)으로 나타내었다.

[0627] 면역침전 및 이뮤노블롯팅 분석

[0628] FGFR3 신호전달에 대한 항체의 영향을 연구하기 위해, 처리를 시작하기 전에 세포를 혈청-비함유 배지에서 밤새 굼겼다. 세포를 0.1% BSA (w/v), RPMI 1640 배지로 희석시킨 항체 또는 0.1% BSA 배지 단독 (Mock)과 인큐베이션하였다. 37°C에서 3시간 후에, FGF1 (최종 농도 15 ng/ml) 및 헤파린 (최종 농도 5-10 μ g/ml)을 샘플의 절반에 첨가하였다. 대조군으로서, 유사한 부피의 헤파린을 단독으로 샘플의 다른 절반에 첨가하였다. 인큐베이션을 10분 동안 계속하였다. 상청액을 흡인에 의해 제거하고, 세포를 빙냉 PBS로 세척하고, 이어서 1 mM 나트륨 오르토바나테이트 및 완전 프로테아제 억제제 카테일 (로셰 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science), 미국 인디애나주 인디애나폴리스)이 보충된 RIPA 완충제 (업스테이트(Upstate), 미국 버지니아주 샤롯데빌)에서 용해시켰다. 용해물에서 불용성 물질을 원심분리에 의해 정화하였다.

[0629] FGFR3을 토끼 폴리클로날 항체 (sc-123, 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 미국 캘리포니아주 산타 크루즈)를 사용하여 면역침전시키고, 나트륨 도데실-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 인산화 FGFR3을 포스포-티로신 (4G10, 업스테이트)에 대해 모노클로날 항체로 평가하였다. 전체 FGFR3을 FGFR3 (sc-13121, 산타 크루즈 바이오테크놀로지)에 대한 모노클로날 항체로 프로빙하였다. FGFR3 신호전달 경로의 인산화 및 활성화는 하기 항체를 사용하여 프로빙하였다: 항-FGFR^{Y653/654}, 항-FRS2 α ^{Y196}, 항-포스포-p44/42 MAPK^{T202/Y204}, 항-전체 p44/42 MAPK 및 항-AKT^{S473}은 셀 시그널링 테크놀로지 (Cell Signaling Technology) (미국 매사추세츠주 댄버스)로부터 수득하고, 항-전체 FRS2 α (sc-8318)는 산타 크루즈 바이오테크놀로지 (미국 캘리포니아주 산타 크루즈)로부터 구입하였다. 화학발광 기질 (ECL 플러스(ECL Plus), 아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하여 블롯을 가시화하였다.

[0630] 항체 에피토프 맵핑

[0631] R3Mab의 에피토프를 결정하기 위해, 각각 15개 아미노산 길이의 13개 중첩 펩티드를 잔기 138 내지 310의 인간 FGFR3의 세포외 도메인을 커버하도록 합성하였다. 펩티드를 C-말단에서 비오틴화시키고, 스트렙타비딘 플레이트 (피어스(Pierce), 미국 일리노이주 록포드) 상에서 밤새 포획하였다. PBS/3% BSA로 차단한 후에, 플레이트를 R3Mab와 인큐베이션하고, HRP-접합된 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치) 및 TMB 퍼옥시다제 발색 기질 (KPL, 미국 매릴랜드주 게이더스버그)을 사용하여 검출하였다.

[0632] 마우스 항-인간 FGFR3 하이브리도마 항체 1G6, 6G1 및 15B2를 ELISA 검정으로 시험하여 이들의 결합 에피토프를 확인하였다. 1G6, 6G1 및 15B2는 인간 FGFR3 IgD2-IgD3 (둘 모두 IIIb 및 IIIc 이소형)에 결합하는 반면, 5B8은 단지 인간 FGFR3-IIIb의 IgD2-IgD3에 결합한다. 경쟁 검정에서, 1G6, 6G1 및 15B2는 인간 FGFR3에 결합하기 위해 서로 경쟁하였으며, 이는 1G6, 6G1 및 15B2가 중첩되는 에피토프를 갖는다는 것을 제안한다. 파지 항체 184.6과 경쟁하는 하이브리도마 항체는 없었으며, 이는 하이브리도마 항체가 184.6으로부터의 유일한 에피토프(들)을 갖는다는 것을 제안한다.

[0633] 마우스 항-FGFR3 항체 1G6, 6G1 및 15B2의 제조 및 분자 클로닝

[0634] BALB/c 마우스를 모노포스포릴 지질 A/트레할로스 디코리노미콜레이트 아주반트 (코릭사(Corixa), 미국 몬타나주 해밀톤)에 재현탁시킨 2.0 μ g의 FGFR3-IIIb (rhFGFR3 (IIIb)/Fc 키메라 (R&D 시스템즈, 카달로그# 1264-FR, lot# CYH025011) 또는 2.0 μ g의 FGFR3-IIIc (rhFGFR3 (IIIc)/Fc 키메라, R&D 시스템즈, 카달로그# 766-FR, lot# CWZ055041)로 일주일에 2회 각각의 뒷발바닥으로 12회 면역화시켰다. 최종 부스팅 3일 후에, 슬와 림프절을 전기적 융합 (하이브리툼(Hybrimmune), 시토 펄스 사이언스(Cyto Pulse Sciences), 미국 매릴랜드주 글렌부르니)을 통해 마우스 골수종 세포주 P3X63Ag.U.1과 융합시켰다. 융합된 하이브리도마 세포를 클로나셀 (ClonaCell)® 하이브리도마 선별 키트 (스텝셀 테크놀로지, 인크.(StemCell Technologies, Inc.), 캐나다 브리티시 콜롬비아주 밴쿠버)로부터 배지 D 중 하이포잔틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 선별을 이용하여 융합되지 않은 슬와 림프절 또는 골수종 세포로부터 선별하였다. 배양 상청액을 처음에 ELISA에 의해 FGFR3-IIIb 및 FGFR3-IIIc에 결합하는 능력에 대해 스크리닝하고, 관심있는 하이브리도마를 이후에 형질감염된 FGFR3-IIIb Ba/F 세포 및 대조군 Ba/F 상에서 FACS에 의해 염색되는 능력 및 항체 차단 활성화에 대해 스크리닝하였다. 이어

서, 선별된 하이브리도마를 제한 회석에 의해 클로닝하였다.

- [0635] RNeasy 미니 키트 (퀴아젠(Qiagen), 독일)를 사용하여 전체 RNA를 마우스 항 인간 FGFR3 III 모노클로날 항체 1G6 및 15B2를 생성하는 하이브리도마 세포로부터 추출하였다. 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 하기 축퇴성 프라이머로 RT-PCR을 사용하여 증폭시켰다:
- [0636] 1G6:
- [0637] 경쇄 (LC) 정방향: 5'-GTCAGATATCGTKCTSACMCARTCTCCWGC-3' (서열195)
- [0638] 중쇄 (HC) 정방향:
- [0639] 5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCARCARTCTGG-3' (서열 196)
- [0640] 6G1:
- [0641] 경쇄 (LC) 정방향: 5'-GTCAGATATCGTGCTGACMCARTCTCC-3' (서열 197)
- [0642] 중쇄 (HC) 정방향:
- [0643] 5'- GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCARCARTCTGG-3' (서열 198)
- [0644] 15B2:
- [0645] 경쇄 (LC) 정방향: 5'-GTACGATATCCAGATGACMCARTCTCC-3' (서열 199)
- [0646] 중쇄 (HC) 정방향:
- [0647] 5'- GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCARCARTCTGG-3' (서열 200)
- [0648] 모든 3개 클론을 위한 경쇄 및 중쇄 역방향 프라이머는 다음과 같다:
- [0649] 경쇄 역방향: 5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (서열 201)
- [0650] 중쇄 역방향:
- [0651] 5'- ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' (서열 202)
- [0652] 정방향 프라이머는 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 특이적이었다. 각각, 중간 보존성이 높은 불변 경쇄 (CL) 및 불변 중쇄 도메인 1 (CH1) 내의 영역에 어닐링되도록 LC 및 HC 역방향 프라이머를 설계하였다.
- [0653] 증폭된 VL을 인간 카파 불변 도메인을 함유하는 pRK 포유동물 세포 발현 벡터 (문헌 [Shields et al., (2000) J. Biol. Chem. 276:659])에 클로닝하였다. 증폭된 VH를 전장 인간 IgG1 불변 도메인을 코딩하는 pRK 포유동물 세포 발현 벡터로 삽입하였다. 중쇄 및 경쇄의 서열을 통상적인 방법을 이용하여 결정하였다.
- [0654] 결정화, 구조 결정 및 정밀화
- [0655] 인간 FGFR3-IIIb ECD (잔기 143-374)를 pAcGP67A 벡터 (BD 바이오사이언스, 미국 캘리포니아주 산 호세)에 클로닝하고, T.ni Pro 세포에서 생성하고, Ni-NTA 칼럼에 이어 크기 배지 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. R3Mab Fab를 이. 콜라이에서 발현시키고, 단백질 G 친화도 칼럼, SP 세파로스 칼럼 및 수퍼텍스 75 칼럼 상에서 순차적으로 정제하였다. Fab를 과량의 FGFR3 ECD와 인큐베이션하여 Fab-FGFR3 복합체를 생성하고, 이어서 복합체를 탈글리코실화하고, 20 mM TrisCl pH 7.5 및 200 mM NaCl 완충제 중 수퍼텍스-200 크기결정 칼럼 상에서 정제하였다. 복합체-함유 분획을 모으고, 20 mg/ml로 농축하고, 결정화 시험에 사용하였다. 구조 결정에 사용되는 결정을 하기 조건으로부터 4°C에서 성장시켰다: 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 pH 6.5, 40% MPD 및 5% PEG8000, 증기 확산 방법 사용. 데이터를 HKL2000 및 스케일팩(Scalepack)을 사용하여 처리하였다 (56). 구조를 프로그램 페이저(Phaser) (57) 및 1RY3 (FGFR3) 및 1N8Z (Fab-단편)의 좌표를 사용하는 분자 교체로 해독하였다. 프로그램 쿄트(Coot) (58) 및 프로그램 Refmac로 20.4%/24.3%의 R/R_{free}로 정밀화된 구조 (59)를 사용하여 모델을 완성시켰다. 좌표 및 구조 인자는 가입 코드 3GRW로 단백질 데이터 뱅크에 기탁하였으며, 또한 USSN 61/163,222 (2009년 3월 25일 출원, 그의 내용이 본원에 참고로 도입됨)에 개시되어 있다.

- [0656] ADCC 검정
- [0657] 인간 PBMC를 해파린처리된 혈액의 피콜(Ficoll) 구배 원심분리에 의해 분리하고, 표적으로의 다발성 골수종 세포주 OPM2 또는 KMS11 또는 방광암 세포주 RT112 또는 UUC-14 및 이펙터 세포로서의 PBMC를 1:100 표적:이펙터 비율로 사용하여 ADCC를 측정하였다. 표적 세포 (10,000개 세포/웰)를 R3Mab 또는 대조군 인간 IgG1로 4시간 동안 37°C에서 처리하였다. 제조업자의 지시 (프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨)에 따라 시토크스-온 (CytoTox-ONE) 균질 막 완전성(Homogeneous Membrane Integrity) 검정을 사용하여 LDH 방출을 측정함으로써 세포독성을 결정하였다. 결과는 식: 세포독성(%) = [(실험적 용해 - 실험적 자발적 용해)/(표적 최대 용해 - 표적 자발적 용해)] x 100 (여기서, 자발적 용해는 항체의 부재하의 비특이적 세포용해이고, 표적 최대 용해는 1% Triton X-100에 의해 유도됨)을 사용하여 특정 세포용해의 백분율로 표현하였다.
- [0658] 결과
- [0659] FGFR3의 유도가능한 shRNA 억다운은 생체내 방광암 성장을 약화시킨다
- [0660] 생체내 방광 종양 성장에 대한 FGFR3의 중요성을 평가하기 위한 시작으로, 본원 발명자들은 시험관내 FGFR3 억다운의 효과를 조사하였다. 여러 FGFR3 작은 간섭 (si) RNA는 WT (RT112, RT4, SW780) 또는 돌연변이체 (UUC-14, S249C 돌연변이) FGFR3을 발현하는 방광암 세포주에서 FGFR3을 효과적으로 하향조절하였다. 모든 4개의 세포주에서 FGFR3 억다운은 배양물에서 증식을 현저하게 저해하였다 (도 15). 다음에, 본원 발명자들은 독시시클린-유도가능한 FGFR3 shRNA를 발현하는 안정한 RT112 세포주를 생성하였다. 독시시클린에 의한 3개의 독립적인 FGFR3 shRNA의 유도는 FGFR3 발현을 감소시키는 반면, EGFP를 표적화하는 대조군 shRNA의 유도는 어떠한 효과도 없었다 (도 7A). 외인성 FGF의 부재하에, 독시시클린 처리는 상이한 FGFR3 shRNA를 발현하는 세포에 의한 [³H]-티미딘 혼입을 감소시키지만, 대조군 shRNA는 그렇지 않았으며 (도 7B), 이는 FGFR3 억다운이 증식을 억제한다는 것을 확인한다. 지수적으로 성장하는 RT112 세포의 추가의 분석은 독시시클린으로의 72시간 처리에 걸친 FGFR3 억다운이 세포 주기의 S 및 G2 기에서 세포의 백분율을 현저하고 특이적으로 감소시키며, G1 기에서 세포의 증가를 수반한다는 것을 밝혀냈다 (도 7C). 2가지 다른 FGFR3 shRNA에서 유사한 효과가 관찰되었다 (도 16A). 하위-이배체 DNA 함량을 갖는 유의한 수의 세포가 검출되지 않았으며, 이는 아포토시스 수준에 변화가 없다는 것을 제한한다. 따라서, RT112 세포의 증식에 대한 FGFR3 억다운의 억제 효과는 주로 세포 주기 진행의 약화 때문이다.
- [0661] 본 발명자들은 다음에 마우스에서 미리-확립된 RT112 종양 이종이식편의 성장에 대한 FGFR3 억다운의 효과를 평가하였다. FGFR3 억다운은 실질적으로 및 특이적으로 종양 성장을 저해하였다 (도 7D, 상부 패널 및 도 16B). 제45일 종양 샘플의 분석으로 대조군 shRNA에 비해 FGFR3 shRNA의 독시시클린에 대한 효과적인 FGFR3 억다운을 확인하였다 (도 7D, 하부 패널). 이들 결과는 FGFR3이 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 RT112 방광암 세포의 성장에 매우 중요하다는 것을 입증한다.
- [0662] 차단 항-FGFR3 모노클로날 항체의 생성
- [0663] 종양 성장에서 FGFR3의 중요성을 추가로 시험하고, 치료 표적으로서 이 수용체의 잠재성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 파지 디스플레이 접근법을 사용하여 길항성 항-FGFR3 모노클로날 항체 (R3Mab로 명명됨)를 개발하였다. 본 발명자들은 FGFR3에 의해 리간드 결합 및 이량체화 둘 모두를 차단하는 능력, 및 WT FGFR3 뿐만 아니라 이 수용체의 가장 보편적인 암-관련 돌연변이체를 억제하는 유일한 능력에 근거하여 이 특정 항체를 선별하였다 (하기 참조). R3Mab는 FGF 결합에 필수적이며 충분한, FGFR3의 세포외 IgD2 및 IgD3 도메인을 표적으로 한다 (4). R3Mab는 인간 FGFR3의 IIIb 및 IIIc 이소형 둘 모두에 결합하였으나, FGFR1, FGFR2 또는 FGFR4에 대해 검출가능한 결합을 나타내지 않았다 (도 8A). 비아코어 분석은 R3Mab가 뮤린, 시노물구스 원숭이 및 인간 FGFR3-IIIc에 대해 유사한 명백한 친화도를 갖는다는 것을 나타낸다 (데이터는 나타내지 않음). 인간 FGFR3에 대한 R3Mab의 친화도를 표 2에 나타내었다.

표 2

비아코어 분석에 의해 결정된 인간 FGFR3에 대한 R3Mab의 친화도

인간 FGFR3 ECD	칩 상에 포획된 R3 Mab		
	kon/(1/Ms)	koff(1/s)	Kd(M)
IIIb	1.80E+06	2.00E-04	1.11E-10
IIIc	9.10E+04	3.20E-04	3.52E-09

[0664]

[0665]

다음에 본 발명자들은 R3Mab가 FGF1 및 FGF9에 대한 FGFR3 결합을 차단하는 능력을 시험하였다. R3Mab는 각각 0.3 nM 및 1.7 nM의 절반-최대 억제 농도 (IC₅₀)로 FGFR3-IIIb 및 -IIIc에 대한 FGF1의 결합을 강하게 억제하였다 (도 8B, C). 유사하게, R3Mab는 각각 1.1 nM 및 1.3 nM의 IC₅₀으로 FGFR3-IIIb 및 -IIIc에 대한 FGF9 결합을 효율적으로 차단하였다 (도 8D, E).

[0666]

R3Mab는 WT FGFR3 및 그의 가장 보편적인 암-관련 돌연변이체 변이체를 억제한다

[0667]

R3Mab가 WT 또는 돌연변이체 FGFR3에 의해 구동된 세포 증식을 억제하는지 조사하기 위해, 본 발명자들은 무린 전구-B 세포 Ba/F3에서의 장소와 FGFR3 발현이 인터류킨 (IL)-3-비의존성, FGF1-의존성 증식 및 생존을 부여한다는 관찰을 이용하였다 (29). FGF1 및 IL-3의 부재하에, WT FGFR3을 안정하게 발현하는 Ba/F3 세포는 생존할 수 없었던 한편, FGF1은 이들의 증식을 크게 향상시켰다 (도 9A). R3Mab는 용량-의존성 방식으로 FGF1-자극된 Ba/F3-FGFR3 세포 증식을 특이적으로 차단하였다 (도 9A). 다음에 본 발명자들은 이들 세포에서 FGFR3 신호전달에 대한 R3Mab의 효과를 평가하였다. FGF1은 FGFR3의 인산화 및 활성화 및 p44/42 MAPK의 수반되는 활성화를 유도하는 한편, R3Mab는 두 분자의 활성화를 효과적으로 저해하였다 (도 9B).

[0668]

방광암에서, FGFR3에서의 체세포 활성화 돌연변이는 IgD2와 IgD3 사이의 링커 영역, 세포의 막근접 도메인 또는 키나제 도메인 내에 밀집한다 (도 9C). 세포의 미스센스 치환은 가장 흔히 언페어드 시스테인을 발생시켜, FGFR3의 리간드-비의존성 이량체화를 유도한다. 이들 돌연변이는 현저하게 상이한 수준의 구성적 FGFR3 활성화의 원인으로, 아마도 세포질 키나제 도메인의 배향에 대한 차별적인 영향 때문일 것이다 (30, 31). 가장 흔한 돌연변이는 S249C, Y375C, R248C, G372C 및 K652E로, 함께 방광암에서 모든 FGFR3 돌연변이의 98%를 차지한다 (32). 본 발명자들은 최적의 치료제는 특정 암에서 과다발현되는 WT FGFR3 단백질 뿐만 아니라 가장 보편적인 종양-관련 FGFR3 돌연변이체를 차단하여야 한다고 판단하였다. R3Mab를 추가로 평가하기 위해, 본 발명자들은 가장 흔한 5가지 FGFR3 돌연변이체 변이체 각각을 안정하게 발현하는 Ba/F3 세포주를 생성하였다. 모든 돌연변이체는 세포 표면에서 유사한 수준으로 발현되었으며, 시스테인 돌연변이체는 리간드 없이 자발적으로 이량체화되었다 (테이타는 나타내지 않음). 상이한 시스테인 돌연변이체를 발현하는 세포주는 FGF1에 대해 가변 성장 반응을 나타내었으며, 이는 이전의 발견과 일치하였다 (30, 31). 이전에 보고된 바와 같이 (33), FGFR3^{R248C}를 발현하는 세포는 구성적, 리간드-비의존성 증식을 나타내고, FGF1에 반응하지 않는다 (도 9D). 유사하게, 가장 흔한 돌연변이, FGFR3^{S249C}는 리간드-비의존성 증식을 부여하였다 (도 9E). 두드러지게, R3Mab는 각 돌연변이체에 의해 구동된 구성적 증식을 저해하였다 (도 9D, E). 막근접 도메인 돌연변이 FGFR3^{G372C} (도 9F) 또는 FGFR3^{Y375C} (도 9G)를 발현하는 세포는 증식을 위해 FGF1을 필요로 하고, 이들의 성장은 R3Mab에 의해 완전히 차단되었다. FGFR3^{K652E}를 발현하는 세포는 약한 리간드-비의존성 증식 및 FGF1에 반응하여 유의한 성장을 나타내었다 (33). R3Mab는 FGFR3^{K652E}의 약한 기저 활성화에 영향을 미치지 않았으나 (테이타는 나타내지 않음), 이 돌연변이체에 의해 매개된 리간드-유도된 증식을 거의 파괴하였다 (도 9H). 따라서, R3Mab는 FGFR3의 WT 및 보편적인 암-관련 돌연변이체 둘 모두를 억제하는 유일한 능력을 갖는다. 또한, R3Mab는 검출가능한 효능제 활성을 나타내지 않는다.

[0669]

별도의 노력으로, 본 발명자들은 다중 마우스-항-인간 FGFR3 하이브리도마 항체를 생성하고 특성화하였다. 어떠한 하이브리도마 항체도 본 발명자들이 시험한 모든 암-연관 FGFR3 돌연변이체를 억제할 수 없었으며 (도 17), 이들은 R3Mab와 중첩 에피토프를 공유하지 않았다.

[0670] 또한, 모든 하이브리도마 항체는 암-연관 FGFR3 돌연변이체 R248C 및 S249C의 증식을 강하게 자극하고, 돌연변이체 Y375C 및 G370C의 증식의 약간의 자극을 보여주는 효능제 활성을 나타내었다. 하이브리도마 항체는 하기와 같이 시험된 FGFR3 돌연변이체에 따라 차등적 수준의 길항작용 및 효능작용을 나타내었다:

	1G6	6G1	15B2
FGFR3-IIIb 야생형	억제	억제	억제
FGFR3-IIIb R248C	2X 자극	4-5X 자극	3-4X 자극
FGFR3-IIIb S249C	2X 자극	4-5X 자극	4-5X 자극
FGFR3-IIIb Y375C	1.2-1.5X 자극	1.2-1.5X 자극	1.2-1.5X 자극
FGFR3-IIIb K652E	50% 억제	60-70% 억제	억제
FGFR3-IIIc	억제	억제	억제
FGFR3-IIIc G370C	영향 없음	20-30% 억제	10-2-% 억제

[0671]

[0672] 따라서, 하이브리도마 항체는 다양한 FGFR3 돌연변이체에 의해 구동된 Ba/F3 세포 증식에 대해 예측할 수 없는 차별적 효과를 나타내었다.

[0673] 마우스-항-인간 FGFR3 하이브리도마 항체의 특성화

[0674] 마우스 항-인간 FGFR3 하이브리도마 항체를 하기와 같이 추가로 특성화하였다:

[0675] (1) 항-FGFR3 무린 하이브리도마 항체가 인간 FGFR3-IIIb 및 IIIc 이소형에 대한 FGF1 결합을 억제하는 능력을 시험하기 위한 검정에서, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 용량-의존성 방식으로 인간 FGFR3-IIIb 및 IIIc 이소형에 대한 FGF1의 결합을 차단할 수 있었다. 약 2000 내지 0.49 ng/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였을 때, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 0.69, 0.87 및 0.72 nM의 IC₅₀ 값으로 FGFR3-IIIb에 대한 FGF1 결합을 차단하였다. 약 5000 내지 1.2 ng/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였을 때, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 각각 0.57, 3.4 및 0.7 nM의 IC₅₀ 값으로 FGFR3-IIIc에 대한 FGF1 결합을 차단하였다.

[0676] (2) 항-FGFR3 무린 하이브리도마 항체가 인간 FGFR3-IIIb 및 IIIc 이소형에 대한 FGF9 결합을 억제하는 능력을 시험하기 위한 검정에서, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 용량-의존성 방식으로 인간 FGFR3-IIIb 및 IIIc 이소형에 대한 FGF1의 결합을 효율적으로 차단하였다. 약 2000 내지 0.49 ng/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였을 때, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 각각 0.13, 0.16 및 0.07 nM의 IC₅₀ 값으로 FGFR3-IIIb에 대한 FGF9 결합을 차단하였다. 약 5000 내지 1.2 ng/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였을 때, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 각각 0.13, 0.11 및 0.07 nM의 IC₅₀ 값으로 FGFR3-IIIc에 대한 FGF9 결합을 차단하였다.

[0677] (3) 전장 항-FGFR3 무린 하이브리도마 항체 1G6, 6G1 및 15B2의 결합 친화도를 비아코어 분석을 사용하여 결정하였다. 이 분석의 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

항체	FGFR3-IIIb			FGFR3-IIIc		
	kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹) koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹) Kd (nM)			kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹) koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹) Kd (nM)		
1G6 mIgG	2.2	3.1	1.4	2.2	2.8	1.3
6G1 mIgG	2.7	3.8	1.4	2.6	3.2	1.2
15B2 mIgG	4.1	29	7.1	3.5	39	11.1

[0678]

[0679] (4) 항-FGFR3 무린 하이브리도마 항체가 인간 FGFR3-IIIb 또는 IIIc에 의해 구동된 Ba/F3 세포 증식을 억제하는 능력을 시험하기 위한 검정에서, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 용량-의존성 방식으로 인간 FGFR3-IIIb 또는 IIIc에 의해 구동된 Ba/F3 세포 증식을 차단할 수 있었다. 약 0.01 내지 100 µg/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였

을 때, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 각각 3-5 nM, 3 nM 및 6-8 nM의 IC₅₀ 값으로 FGFR3-IIIb에 의해 구동된 Ba/F3 세포 증식을 차단하고, 각각 10-35 nM, 24 nM 및 60 nM의 IC₅₀ 값으로 FGFR3-IIIc에 의해 구동된 Ba/F3 세포 증식을 차단하였다.

[0680] (5) 항-FGFR3 무린 하이브리도마 항체가 인간 FGFR3-IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포에서 FGF1-유도된 신호전달을 억제하는 능력을 시험하기 위한 검정에서, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 약 0.25 내지 6.75 μ g/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였을 때 용량-의존성 방식으로 인간 FGFR3-IIIb를 발현하는 Ba/F3 세포에서 FGF1-유도된 신호전달을 차단할 수 있었다. 25 ng/ml의 FGF1을 이 실험에 사용하였다. FGF1의 부재하에, 항체 처리는 FGFR3 활성화에 영향을 미치지 않았다.

[0681] (6) 항-FGFR3 무린 하이브리도마 항체가 인간 FGFR3-IIIc를 발현하는 Ba/F3 세포에서 FGF1-유도된 신호전달을 억제하는 능력을 시험하기 위한 검정에서, 항체 1G6, 6G1 및 15B2는 약 0.25 내지 6.75 μ g/ml의 항체 농도 범위에 걸쳐 시험하였을 때 용량-의존성 방식으로 인간 FGFR3-IIIc를 발현하는 Ba/F3 세포에서 FGF1-유도된 신호전달을 차단할 수 있었다. 25 ng/ml의 FGF1을 이 실험에 사용하였다. FGF1의 부재하에, 항체 처리는 FGFR3 활성화에 영향을 미치지 않았다.

[0682] FGFR3과 R3Mab의 상호작용을 위한 구조적 기반

[0683] FGFR3과의 상호작용의 R3Mab의 모드를 파악하기 위해, 본 발명자들은 FGFR3-IIIb IgD2 및 D3 영역을 잇는 13개 중첩 펩티드의 패널을 합성하고, R3Mab에 대한 이들의 결합을 시험하였다. 펩티드 3 (잔기 164-178) 및 11 (잔기 269-283)은 R3Mab에 대해 특이적인 결합을 나타내고, 펩티드 3은 보다 강한 상호작용을 가졌으며 (도 10A), 이는 FGFR3 상의 상응하는 영역이 R3Mab에 의한 인식에 중요하다는 것을 나타낸다. FGF2와 복합체를 형성한 FGFR1의 이전의 결정학 연구는 FGF 및 헤파린에 대한 직접적인 결합 및 수용체 이량체화에 참여하는 중요한 수용체 잔기를 확인하였다 (34). FGFR1에서 기능적으로 중요한 부위를 갖는 FGFR3 펩티드 3 및 11의 정렬은 이들 펩티드가 직접적인 FGF2 결합, 수용체 이량체화 및 헤파린과의 상호작용에 필수적인 상응하는 FGFR1 잔기를 포함한다는 것을 밝혀냈다 (도 10B). 이들 데이터는 FGFR3 상의 R3Mab의 에피토프가 리간드 결합 및 수용체-수용체 상호작용에 참여하는 수용체 잔기와 중첩된다는 것을 나타낸다.

[0684] 다음에 본 발명자들은 R3Mab의 Fab 단편과 인간 FGFR3-IIIb의 세포외 IgD2-D3 영역 사이의 복합체를 결정화하고, 2.1Å 해상도에서 X-선 구조를 결정하였다 (도 10C, D; 표 4). 이 복합체에서, 대략 1400 Å² 및 1500 Å²의 용매-접근가능한 표면 구역이 각각 FGFR3 및 Fab 상에 매몰되었다. 매몰된 인터페이스의 약 80%가 IgD2를 포함하는 한편, 나머지는 링커 및 IgD3 영역을 수반한다. 복합체의 Fab 측면 상에서, 매몰된 인터페이스의 약 40%는 상보성 결정 영역 (CDR)-H3, 20% CDR-H2, 20% CDR-L2를 포함하고, 부수적 부분은 다른 CDR 및 프레임워크 잔기로부터의 것이다. 두드러지게, CDR-H3으로부터의 아미노산 (AA)은 2개의 β -가닥을 형성하고, 이는 IgD2의 β -시트로 확장된다 (도 10D). Fab는 FGFR3의 FGF 결합 부위를 구성하는 AA 및 다양한 이량체 FGF:FGFR 복합체 (예를 들어, PDB 코드 1CVS, (34); 및 도 10C, 회색/크로스해칭 및 암회색의 구역)에서 이전에 확인된 수용체 이량체화 인터페이스를 형성하는 잔기와 상호작용한다. 결정학에 의해 확인된 상호작용 인터페이스는 펩티드-기반 데이터와 완전히 일치하였다 (도 18A, B). 이들 결과는 함께 R3Mab가 리간드 결합을 억제하는 방법을 밝혀냈으며, FGFR3에 대한 R3Mab의 결합이 수용체 이량체화를 방해할 수 있음을 추가로 제안하였다. R3Mab와 접촉하는 FGFR3 아미노산을 표 5에 나타내었다. 이 구조에 대한 결정학적 좌표를 가입 코드 3GRW로 단백질 데이터뱅크에 기탁하였다.

표 4

결정학적 분석의 개요

데이터 수집	FGFR3-IIIb: R3Mab Fab
공간군	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
셀 파라미터	a=58.5, b=99.3, c=143.7
해상도 (Å)	25-2.1
R _{sym} ^a	0.098 (0.663) ^b
관찰 횟수	288498
고유 반사	49851
완전성 (%)	99.9 (100.0) ^b
정밀화	
해상도 (Å)	20-2.1
반사 횟수 ^c	46714
최종 R , R _{free} (F>0)	0.187, 0.224
비-H 원자의 개수	5270
아미노산의 개수	650
솔레이트	1
당	1
용매 원자	274
Rmsd 결합 (Å)	0.011
Rmsd 각 (°)	1.4

^a $R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ $\langle I \rangle$ 는 고유 반사의 대칭 관련 관찰의 평균 강도이다.

^b 괄호 안의 수는 최고 해상도 셀을 나타낸다.

^c $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$. R_{free} 는 R로 계산되나, 반사 중 5%는 모든 정밀화로부터 제외된다.

[0685]

표 5

R3Mab와 접촉한 FGFR3 내의 잔기
인터페이스 내의 잔기의 잔기 매몰된 표면

THR 154	0.10
ARG 155	16.50
ARG 158	105.40
MET 159	6.00
LYS 161	52.50
LYS 162	1.70
LEU 163	12.30
LEU 164	55.10
ALA 165	10.10
VAL 166	10.60
PRO 167	45.50
ALA 168	22.60
ALA 169	63.60
ASN 170	75.40
THR 171	83.00
VAL 172	1.70
ARG 173	91.70
PHE 174	1.50
ARG 175	95.60
PRO 177	15.90
GLY 202	2.10
LYS 205	63.40
ARG 207	67.60
GLN 210	31.60

[0686]

SER 212 0.40
VAL 214 26.40
GLU 216 48.90
SER 217 1.80
TYR 241 15.90
LEU 246 3.10
GLU 247 1.80
ARG 248 46.90
TYR 278 32.20
SER 279 1.80
ASP 280 19.80
ALA 281 3.00
GLN 282 24.80
PRO 283 0.50
SER 314 1.20
GLU 315 82.60
SER 316 33.20
VAL 317 56.60
GLU 318 51.50

[0687]

[0688]

본 발명자들은 R3Mab-FGFR3 구조를 FGF1과 복합체를 형성한 FGFR3-IIIc의 이전에 공개된 구조와 비교하였다 (4, 35) (도 10E, 10F). 항체-수용체 및 리간드-수용체 복합체의 중첩은 FGFR3-IIIc를 FGFR3-IIIb와 구별하는 영역을 제외하고, 개별 수용체 도메인 내에 주요한 형태 차이가 없다는 것을 밝혀냈으나; IgD2에 대한 IgD3의 배향은 크게 상이하였다 (도 10E, 백색 및 회색; 도 10F, 백색 및 회색-메쉬). IgD2 및 IgD3의 상대적 위치가 리간드 결합에 중요하므로, R3Mab 결합시 IgD3에 의해 채택된 다른 형태는 FGFR3과의 리간드 상호작용을 방해하는 추가의 메커니즘을 제공할 수 있다.

[0689]

R3Mab는 방광암 세포에서 내인성 WT 및 돌연변이체 FGFR3을 억제한다

[0690]

R3Mab가 방광암 세포에서 FGFR3 기능을 저해할 수 있는지 평가하기 위해, 본 발명자들은 우선 WT FGFR3을 발현하는 RT112 및 RT4 세포주를 조사하였다. R3Mab는 RT112 세포에 의한 $[^3\text{H}]$ -티미딘 혼입을 강하게 억제하였고 (도 11A), 비록 보다 중간 정도였으나 유의한 RT4 세포 증식 저해를 나타내었다 (도 19A). FGFR3 활성화에 대한 R3Mab의 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 RT112 세포에서 FGFR3의 인산화를 조사하였다. Ba/F3-FGFR3 세포에서의 결과와 일치하게 (도 9B), R3Mab는 FGF1-유도된 FGFR3 인산화를 현저하게 약화시켰다 (도 11B). 다음에 본 발명자들은 FGFR3 신호전달의 3가지 하류 매개자인 FRS2 α , AKT 및 p44/42 MAPK의 인산화를 조사하였다. FGF1은 RT112 세포에서 이들 분자를 강하게 활성화시킨 한편, R3Mab는 이 활성화를 유의하게 감소시켰다 (도 11B). 유사하게, R3Mab는 RT4 세포에서 FGFR3 및 MAPK의 FGF1-유도된 인산화를 저해하였다 (도 19B).

[0691]

다음에 본 발명자들은 R3Mab가 인간 방광암 세포에서 내인성 돌연변이체 FGFR3의 활성화를 억제할 수 있는지 조사하였다. S249C는 방광암에서 가장 흔한 FGFR3 돌연변이이다 (도 9C). 2가지 이용가능한 세포주, UMUC-14 및 TCC-97-7은 돌연변이화된 FGFR3^{S249C} 대립유전자를 보유한다 (Ref. 36 및 데이터는 나타내지 않음). R3Mab가 배양물에서 UMUC-14 세포의 지수 성장에 영향을 미치지 않았으나 (데이터는 나타내지 않음), 이는 이들 세포의 클론 성장을 유의하게 감소시켰다 (도 11C). 구체적으로, R3Mab는 직경이 120 μm 보다 큰 콜로니의 개수를 대조군 항체에 비해 대략 77% 감소시켰다 (도 11D). 또한, R3Mab는 배양물에서 TCC-97-7 세포에 의한 $[^3\text{H}]$ -티미딘 혼

입을 억제하였다 (도 19C).

[0692] S249C 돌연변이는 FGFR3의 리간드-비의존성 활성화를 초래한다고 보고되었다 (26, 30). 사실상, FGFR3^{S249C}는 UMUC-14 세포 및 TCC-97-7 세포에서 FGF1 처리에 상관없이 구성적으로 인산화되는 한편, R3Mab는 두 세포주에서 FGFR3^{S249C}의 구성적 인산화를 대조군 항체에 비해 감소시켰다 (도 11E, 19D).

[0693] R3Mab는 FGFR3^{S249C}에 의한 이량체 형성을 억제한다

[0694] R3Mab가 방광암 세포에서 구성적 FGFR3^{S249C} 신호전달 및 증식을 억제하는 능력은 놀랍게도 이 돌연변이체가 디솔 피드-연결된, 리간드-비의존성 이량체화를 경험할 수 있다는 것을 간주한다 (26, 30). R3Mab가 FGFR3^{S249C}를 억제하는 방법을 조사하기 위해, 본 발명자들은 UMUC-14 세포에서 이 돌연변이체의 올리고머 상태에 대한 R3Mab의 효과를 조사하였다. 환원 조건하에, FGFR3^{S249C}는 단량체 크기와 일치하는 약 97 kDa의 단일 밴드로 이동한다 (도 12A). 비-환원 조건하에, 대조군 항체로 처리된 세포에서, FGFR3^{S249C}의 큰 분획은 FGF1 첨가와 상관없이 구성적 이량체 상태를 나타내는 약 200 kDa의 밴드로 나타났다 (도 12A). R3Mab 처리는 이량체의 양을 실질적으로 감소시켰으며, 단량체의 증가를 수반하였다 (도 12A). 일반적으로, R3Mab는 FGF1 처리에 상관없이 TCC-97-7 세포에서 FGFR3^{S249C} 이량체의 수준을 감소시켰다 (도 19E).

[0695] R3Mab는 방광암 세포에서 FGFR3^{S249C} 이량체 수준을 어떻게 감소시키는가? 한 가지 가능한 설명은 이것이 항체-유도된 FGFR3 내재화 및 엔도솜 또는 리소솜을 통한 트래피킹(trafficking)을 통해 FGFR3^{S249C} 이량체를 파괴할 수 있다는 것이다. 본 발명자들은 엔도시토시스로의 약리학상 개입에 의해 이 가능성을 시험하였다. 그럼에도 R3Mab는 FGFR3^{S249C} 내재화의 실질적인 차단에도 불구하고 다양한 엔도시토시스 억제제로 미리-처리된 UMUC-14 세포에서 이량체의 양을 감소시켰다 (도 20A, B). 따라서, R3Mab에 의한 이량체 파괴는 엔도시토시스에 비의존성이었다. 또 다른 가능한 설명은 세포 FGFR3^{S249C}가 동적 단량체-이량체 평형 상태로 존재할 수 있고; 이에 따라 단량체 FGFR3^{S249C}에 대한 R3Mab의 결합이 이량체 형성을 방해할 수 있으며, 이에 의해 평형이 단량체 상태로 이동한다는 것이다. 이 가능성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 언페어드 시스테인의 유리 술포히드릴 기와 선택적으로 반응하여 이를 차단하는 비-세포-투과제 5,5'-디티오비스 2-니트로벤조산 (DTNB)을 사용하였다 (37). UMUC-14 세포를 DTNB로 처리하면 이량체가 분해된 FGFR3^{S249C} 단량체의 축적을 유도하였으며 (도 12B), 이는 FGFR3^{S249C}가 단량체와 이량체 사이에 동적 평형 상태로 존재한다는 것을 나타낸다.

[0696] R3Mab가 이 평형 상태에 영향을 미치는지 시험하기 위해, 본 발명자들은 FGFR3^{S249C}의 IgD2-D3 도메인을 포함하는 가용성 재조합 단백질을 생성하고, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 이량체를 분리하였다. 본 발명자들은 매우 낮은 농도의 환원제 (25 μ M의 DTT)의 존재하에 이량체를 완충제 또는 항체와 인큐베이션하고, 비-환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 수용체의 올리고머 상태를 분석하였다. R3Mab는 약 50 kDa 이량체가 분해된 단량체 FGFR3^{S249C}를 나타내는 약 25 kDa 밴드의 출현을 mock 또는 항체 대조군에 비해 유의하게 가속화시켰으며 (도 12C); 사실상, 이량체에서 2시간 감소는 R3Mab의 존재하에 실질적으로 보다 완전하였다. 이들 결과는 R3Mab가 FGFR3^{S249C}의 단량체 상태와 이량체 상태의 평형 상태를 단량체가 우세하게 이동시킨다는 것을 나타낸다.

[0697] R3Mab는 FGFR3 하향조절을 증진시키지 않는다

[0698] 본 발명자들은 FGFR3 항체-처리된 세포에서 FGFR3 내재화 및 분해를 분석하여 FGFR3 하향조절에 대한 R3Mab (클론 184.6.1) 및 항-FGFR3 하이브리도마 항체의 효과를 조사하였다. 야생형 FGFR3 (RT112) 또는 돌연변이화된 FGFR3 (TCC97-7의 S249C)을 발현하는 방광암 세포주를 4 내지 24시간 동안 R3Mab 또는 하이브리도마 항체 1G6 또는 6G1로 처리한 후에, 세포 용해물을 전체 FGFR3 수준의 웨스턴 블롯 분석을 위해 수확하였다. R3Mab로의 처리는 FGFR3 수준을 감소시키지 않은 한편, 하이브리도마 mab 1G6 및 6G1로의 처리는 FGFR3 수준을 유의하게 감소시켰다. 이들 결과는 R3Mab가 FGFR3 하향조절을 증진시키지 않는 한편, mab 1G6 및 6G1은 FGFR3 수용체 내재화 및 하향조절을 증진시킨다는 것을 제안하였다. 별도의 실험에서, 표면 FGFR3 수준을 FACS 분석을 이용하여 조사하였다. UMUC-14 세포 (FGFR3 S249C 돌연변이 함유)의 R3Mab (클론 184.6.1) 처리 24시간 후에, 세포 표면 FGFR3 수준이 약간 증가하였다. 이들 결과는 R3Mab 처리가 FGFR3 하향조절을 증진시키지 않는다는 것을

입증한다.

[0699] R3Mab는 다중 종양 모델에서 성장 및 FGFR3 신호전달을 억제한다

[0700] 다음에, 본 발명자들은 생체내에서 방광암 세포의 성장에 대한 R3Mab의 효과를 조사하였다. 본 발명자들은 nu/nu 마우스에게 RT112 세포 (WT FGFR3을 발현함)를 주사하여, 종양을 약 150 mm³의 평균 부피로 성장시키고, 동물에게 매주 2회 비히클 또는 R3Mab를 투여하였다. 제27일에 비히클 대조군과 비교하여, 5 또는 50 mg/kg의 R3Mab 처리는 각각 종양 성장을 약 41% 또는 73% 저해하였다 (도 13A). 처리 48시간 또는 72시간 후에 수집한 종양 용해물을 분석하여, R3Mab가 인산화된 FRS2 α의 수준을 현저하게 감소시킨다는 것을 밝혀냈다 (도 13B). 흥미롭게도, 전체 FRS2 α 단백질 수준이 또한 R3Mab-처리된 종양에서 보다 낮았으며, 이는 FGFR3 억제가 FRS2 α의 하향조절을 추가로 유발할 수 있다는 것을 제안한다. R3Mab는 또한 전체 MAPK 수준에 영향을 미치지 않으면서 종양에서 인산화된 MAPK의 양을 저하시켰다 (도 13B). 따라서, R3Mab는 WT FGFR3에 의한 신호전달의 차단과 함께 RT112 종양 이종이식편의 성장을 억제한다.

[0701] 본 발명자들은 다음에 돌연변이체 FGFR3을 발현하는 이종이식편의 성장에 대한 R3Mab의 효과를 조사하였다. R3Mab 처리는 Ba/F3-FGFR3^{S249C} 종양의 진행을 매우 약화시켰다 (도 13C). 또한, R3Mab는 UMUC-14 방광 암종 이종이식편의 성장을 유의하게 억제하였다 (도 13D). R3Mab가 생체내에서 FGFR3^{S249C} 활성화에 영향을 미치는지 평가하기 위해, 본 발명자들은 처리 24시간 또는 72시간 후에 수집한 종양 용해물에서 FGFR3^{S249C} 이량체의 수준을 평가하였다. 비-환원 조건하에, FGFR3^{S249C} 이량체의 양은 대조군에 비해 R3Mab 처리된 종양에서 실질적으로 더 적은 반면, 환원 조건하에 검출된 양에 의해 판단된 전체 FGFR3^{S249C} 수준은 변화를 거의 나타내지 않았다 (도 13E). 세포 배양물에서의 결과와는 반대로, 종양 용해물에서는 FGFR3^{S249C} 단량체의 명백한 축적이 관찰되지 않았다 (도 13E 대 12A). 이는 이 연구에서 사용된 토끼 폴리클로날 항-FGFR3 항체에 의한 비-환원 조건하의 단량체 FGFR3에 대한 약한 검출 감수성 때문일 수 있다 (도 21). 중요하게도, R3Mab는 또한 UMUC-14 종양에서 MAPK의 인산화 및 활성화를 유의하게 억제하였으며 (도 13E), 이는 R3Mab가 생체내에서 FGFR3^{S249C}의 활성을 억제한다는 것을 제안한다. 본 발명자들은 임의의 생체내 연구에서 어떠한 유의한 체중 감소 또는 다른 육안 이상을 관찰하지 못하였다. 또한, 마우스에서 수행된 안전성 연구에서, 인간 및 무린 FGFR3 둘 모두에 대해 유사한 친화도로 결합하는 R3Mab는 방광을 비롯한 임의의 기관에서 어떠한 인식가능한 독성도 나타내지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 이들 데이터는 함께 R3Mab에 대한 다중 노출이 마우스에서 잘 허용된다는 것을 나타낸다.

[0702] 다발성 골수종 이종이식편 모델에서 R3Mab의 항-종양 활성은 ADCC를 포함한다

[0703] R3Mab가 다발성 골수종에 대한 치료적 잠재성을 보유할 수 있을지 평가하기 위해, 본 발명자들은 우선 배양물에서 3가지 t(4;14)+ 세포주의 증식 및 생존에 대한 R3Mab의 효과를 시험하였다. UTMC-2 세포는 WT FGFR3을 보유하는 한편, OPM2 및 KMS11은 각각 K650E 및 Y373C 치환을 보유한다 (7). 배양물에서, R3Mab는 UTMC-2 세포의 FGF9-유도된 증식을 완전히 제거하였다 (도 22A). R3Mab는 OPM2 세포의 성장을 약간 억제하였으나, KMS11 세포의 증식에 대해 명백한 효과를 나타내지 않았다 (도 22B, C). UTMC-2 세포는 마우스에서 종양을 형성하지 않으므로, 본 발명자들은 OPM2 및 KMS11 종양에 대한 R3Mab의 효능을 평가하였다. R3Mab는 두 세포주에서 이종이식편 종양 성장을 거의 완전히 정지시켰다 (도 14A, B).

[0704] 시험관내 및 생체내에서 OPM2 및 KMS11 종양 세포에 대한 R3Mab의 활성의 현저한 차이는 R3Mab가 이들 FGFR3-과다발현 종양에 대항하는 Fc-매개 면역 이펙터 기능을 지지할 수 있다는 가능성을 제안하였다. 두 세포주는 높은 수준의 CD55 및 CD59 (보체 경로의 두 억제제)를 발현하였으며 (데이터는 나타내지 않음), 이에 따라 보체-의존성 세포독성은 관찰되지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 이어서, 본 발명자들은 ADCC에 초점을 맞추었다. ADCC는 항체가 표적 세포 상에서 그의 항원에 결합하고, 그의 Fc 영역을 통해 면역 이펙터 세포 상에서 발현된 Fc γ 수용체 (Fc γ R)를 사용할 때 일어난다 (38). 시험관내에서 ADCC를 시험하기 위해, 본 발명자들은 R3Mab 또는 대조군 항체의 존재하에 KMS11 또는 OPM2 세포를 새로 분리된 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)와 인큐베이션하였다. R3Mab는 두 골수종 세포주에 대한 유의한 PBMC 세포용해 활성을 매개하였다 (도 14C, D). 반면에, R3Mab는 방광암 RT112 또는 UMUC-14 세포의 세포용해를 지지하지 않았다 (도 14E, F). 스캐처드 분석에 의해 측정된 바와 같이, 다발성 골수종 세포는 방광 암종 세포주보다 실질적으로 더 많은 세포-표면 FGFR3을 발현하였다 (세포 당 약 5-6 배 더 많은 수용체; 도 23A, B).

[0705] 생체내에서 R3Mab의 활성에 대한 ADCC의 기여를 알아보기 위해, 본 발명자들은 이전에 특성화된 D265A/N297A

(DANA) 돌연변이를 항체의 Fc 도메인에 도입하였다. 항체의 Fc 도메인에서 이러한 이중 치환은 Fc γ R에 대한 그의 결합을 제거하여 (39), 면역 이펙터 세포의 동원을 방해한다. DANA 돌연변이는 FGFR3에 대한 R3Mab 결합 또는 FGFR3 활성의 시험관내 억제력을 변경시키지 않으며, 마우스에서 R3Mab의 약동학을 변화시키지 않았으나 (데이터는 나타내지 않음); 이는 OPM2 또는 KMS11 이종이식편에 대한 생체내 활성을 실질적으로 제거하였다 (도 14G, H). 반면에, DANA 돌연변이는 RT112 및 UMC-14 방광암 이종이식편을 향한 R3Mab의 항-종양 활성을 변경시키지 않았다 (도 24A, B). 이들 결과는 함께 Fc-의존성 ADCC가 OPM2 및 KMS11 다발성 골수종 이종이식편에 대한 R3Mab의 효능에 중요한 역할을 수행한다는 것을 제안한다.

[0706] 추가의 이종이식편 연구

[0707] R3Mab (클론 184.6.1N54S)를 다음과 같이 추가로 특성화하였다:

[0708] (a) R3Mab를 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 간암 세포주 (Huh7)에 기초한 종양 이종이식편 모델을 사용하여 생체내 효능에 대해 시험하였다. 5 mg/kg 및 30 mg/kg의 항체 농도에서 시험하였을 때, R3Mab는 생체내에서 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 종양 성장은 대조군 동물에서의 종양 성장에 비해 약 50% 억제되었다.

[0709] (b) R3Mab를 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 FGFR3을 발현하는 유방암 세포주 (Ca1-51)에 기초한 종양 이종이식편 모델을 사용하여 생체내 효능에 대해 시험하였다. 이 효능 연구로부터의 결과는 약 1 mg/kg 내지 100 mg/kg의 항체 농도에서 시험하였을 때 R3Mab 항체가 생체내에서 종양을 억제할 수 있다는 것을 보여주었다. 종양 성장은 대조군 동물에서의 종양 성장에 비해 약 30% 억제되었다.

[0710] 논의

[0711] t(4;14)+ 다발성 골수종 환자에서의 불량한 예후 및 여러 실험 모델에서의 활성화된 FGFR3의 형질전환 활성화와 FGFR3 과다발현의 관련성은 중요한 종양원성 구동인자로 FGFR3을 확립하였으며, 이에 따라 이를 이 혈액 악성종양에서 잠재적 치료 표적으로 확립하였다. 반면에, 방광 암종에서 높은 빈도의 FGFR3의 돌연변이 및/또는 과다발현의 보고에도 불구하고 (24, 25, 40), 이 상피 악성종양에서 FGFR3 신호전달을 위한 중요한 역할이 생체내에서 확립되지 않았다. 또한, 방광암에서 FGFR3 억제의 치료적 잠재성은 아직 규정되지 않았다. 여기서, 본 발명자들은 FGFR3으로의 유전적 또는 약리학적 개입이 마우스에서 여러 인간 방광암 이종이식편의 성장을 억제한다는 것을 밝혀냈다. 이들 결과는 이 설정에서 FGFR3 기능이 종양 성장에 중요하다는 것을 입증하였으며, 이는 방광암에서 종양원성 구동인자 및 치료 표적으로서의 이 수용체의 잠재적 중요성을 강조하였다. FGFR3 기능의 차단은 WT 또는 돌연변이체 FGFR3을 비슷하게 발현하는 이종이식편의 성장을 억제하였으며, 이는 두 가지 형태의 수용체가 방광 종양 진행에 유의하게 기여할 수 있다는 것을 제안한다. 방광암에서는 훨씬 덜 빈번할지라도, FGFR3 돌연변이 또는 과다발현은 자궁경부 암종 (40), 간세포 암종 (41) 및 비소세포 폐암 (42, 43)을 비롯한 다른 고형 악성 종양에서 확인되었으며, 이는 추가의 유형의 상피암에 대한 FGFR3의 잠재적 기여를 제안한다.

[0712] 다양한 악성종양에서 FGFR3의 명백한 관련은 이 수용체를 표적화된 치료를 위한 흥미로운 후보로 확인하였다. FGFR3 키나제 활성을 억제할 수 있는 소분자 화합물이 기재되어 있는 한편 (18-22, 44), FGFR 부류 내의 키나제 도메인의 밀접한 상동성은 FGFR3-선택적인 억제제의 개발을 방해하였다. 보고된 억제제의 선택성 부족은 특정 암 유형의 생물학에 대한 FGFR3의 상대적 기여를 구별하는 것을 어렵게 하고, 또한 이는 안전성 부담을 보유하여 최대 용량 수준을 한정할 수 있으며, 이에 따라 FGFR3의 최적의 억제를 제한하였다. 따라서, FGFR3의 선택적이고 특이적인 표적화를 달성하기 위해, 본 발명자들은 항체-기반 전략으로 전환하였다. 본 발명자들은 최적의 치료 항체는 WT 뿐만 아니라 FGFR3의 우세한 암-연관 돌연변이체를 차단할 수 있어야 한다고 판단하였다. 또한, FGFR3의 이량체화가 그의 활성화에 중요하므로, 리간드 결합을 차단할 뿐만 아니라 수용체 이량체화를 방해하는 항체가 우수할 수 있다. 추가의 바람직한 특성은 전장 항체의 천연 프레임워크에 의해 부여된 Fc-매개 이펙터 기능 및 긴 혈청 반감기를 지지하는 능력을 포함할 것이다. 본 발명자들은 이러한 특징을 모두 합하여 R3Mab를 생성하는 항체 분자를 확인하기 위한 본 발명자들의 스크리닝 및 조작 노력에 초점을 맞추었다. 결합 연구는 R3Mab가 FGFR3의 IIIb 및 IIIc 이소형 둘 모두와의 상호작용을 위해 FGF 리간드와 경쟁하는 능력을 입증하였다. 형질감염된 BaF/3 세포주로의 추가의 실험은 R3Mab가 WT 및 우세한 암-관련 FGFR3 돌연변이체 둘 모두를 차단하는 놀라운 능력을 확인하였다. 또한, R3Mab는 WT FGFR3 또는 FGFR3^{S249C} (방광암 질환에서 수용체의 가장 흔한 돌연변이체임)를 발현하는 방광암의 여러 이종이식편 모델에서 유의한 항-종양 활성을 나타내었다. 약리학 연구는 이들 모델에서의 항-종양 활성 R3Mab가 그의 하류 매개자 FRS2 α 및 MAPK의 감소된 인산화에 의해 증명된, FGFR3 신호전달의 억제에 근거한다는 것을 제안하였다. 이들 데이터는 또한 본 발명자들의 FGFR3

shRNA 연구에 의해 입증된 바와 같이 FGFR3이 방광 종양 진행에 필요한 것으로 결론을 보장하였다.

[0713] 방광암에서의 FGFR3 돌연변이는 흑색종에서 B-Raf의 흔한 돌연변이를 연상시키는, 고정 악성 종양에서 단백질 키나제의 가장 흔한 종양원성 변경 중 하나를 나타낸다 (45). FGFR3에서의 활성화 돌연변이의 대부분은 연페어드 시스테인을 생성시켜, 리간드-비의존성 수용체 이량체화 및 다양한 정도의 구성적 활성화를 일으킨다. 1가 항-FGFR3 Fab 단편을 사용한 이전의 연구는 특정 FGFR3 돌연변이체에 대해 차등적 억제 활성을 나타내었으나 (46); 이 가변 효과에 대한 분자적 근거는 조사되지 않았다. 1가 항체 단편에 비해, 2가 항체는 항원의 밀집을 유도하는 능력을 갖고, 수용체 티로신 키나제의 경우에는 수용체 올리고머화 및 활성화를 유발할 수 있다. R3Mab는 그의 전장 2가 배위에도 불구하고 WT FGFR3 및 리간드-의존성인 변이체 (FGFR3^{G372C}, FGFR3^{Y375C}), 구성적으로 활성인 변이체 (FGFR3^{R248C}, FGFR3^{S249C}) 또는 둘 모두인 변이체 (FGFR3^{K652E})를 포함하는 광범위한 FGFR3 돌연변이체의 보편적인 억제를 나타내었다. 이들 결과는 하기 의문을 제기한다: R3Mab는 어떻게 WT 및 다양한 FGFR3 돌연변이체 (디설파이드-연결된 변이체 포함) 둘 모두를 길항하는가?

[0714] FGFR1와의 서열 정렬에 기초하여, R3Mab에 의해 인식되는 펩티드 에피토프는 리간드 및 헤파린에 대한 결합 및 수용체 이량체화에 관련된 FGFR3 잔기와 중첩된다. 이 결론은 R3Mab와 FGFR3의 세포외 영역 사이의 복합체의 결정학 연구에 의해 확인되었다. X-선 구조는 항체가 리간드-수용체 상호작용 및 수용체-수용체 접촉에 중요한 IgD2 및 IgD3의 영역에 결합한다는 것을 밝혀냈다. 따라서, R3Mab는 리간드 결합에 대한 경쟁 및 수용체 이량체화의 방해 둘 모두에 의해 WT FGFR3을 차단할 수 있다. R3Mab는 낮은 구성적 활성을 갖지만 완전한 활성화를 위해 리간드를 필요로 하는, FGFR3^{K652E}를 억제하는 유사한 메커니즘을 사용할 수 있다. 또한, R3Mab 결합은 IgD2에 대해 FGFR3 IgD3의 상대적 배향을 변화시킨다. 이 발견은 항체가 또한 신호 전달에 좋지 않은 형태를 강요함으로써 수용체 활성화를 억제할 수도 있다는 형식적 가능성을 제시한다 (추가의 연구를 필요로 하는 개념).

[0715] R3Mab가 연페어드 시스테인을 보유하는 FGFR3 변이체를 차단하는 방법을 보다 잘 파악하기 위해, 본 발명자들은 가장 흔한 돌연변이체, FGFR3^{S249C}를 보다 자세하게 분석하였다. 유리-설파히드릴 차단제 DTNB로의 실험은 FGFR3^{S249C}의 단량체 상태와 이량체 상태의 동적 평형 상태를 나타냈다. 내인성 산화환원 조절자에 의해 조정되는 산화 상태와 환원 상태 사이의 유사한 평형 상태가 NMDA 수용체에 대해 보고되어 있다 (46). FGFR3^{S249C}를 발현하는 방광암 세포를 R3Mab와 인큐베이션하면 수용체 이량체의 양이 감소하고, 단량체 수준의 증가가 수반되었다. 또한, FGFR3^{S249C}의 정제된 IgD2-D3 단편은 용액 중에서 이량체를 형성하였고; R3Mab와 인큐베이션하였을 때, 이량체는 꾸준히 사라지는 한편 단량체 FGFR3^{S249C}가 축적되었다. 구조 분석과 함께, 이들 결과는 R3Mab가 단량체 FGFR3^{S249C}를 포획하고, 그의 이량체화를 방해한다는 것을 제안한다. 시간이 경과함에 따라, R3Mab는 평형 상태를 단량체 상태를 향하여 이동시켜 구성적 수용체 활성을 차단한다. 이 메커니즘은 또한 R3Mab가 FGFR3의 다른 시스테인 돌연변이체를 억제하는 방법을 설명할 수도 있다.

[0716] 이 연구의 또 다른 중요한 발견은 생체내에서 t(4;14)+ 다발성 골수종 세포주 OPM2 및 KMS11에 대한 R3Mab의 강력한 항-종양 활성이었다. 반면에, R3Mab는 배양물에서 이들 세포의 증식 또는 생존에 대해 크지 않은 영향에서 최소의 영향을 나타내었다. OPM2 및 KMS11 세포는 상대적으로 높은 세포 표면 수준의 FGFR3 (RT112 및 UMUC-14 방광 암종 세포보다 5 내지 6배 더 높음)을 발현한다. 이러한 보다 높은 항원 농도는 R3Mab가 Fc γR-보유 면역 이펙터 세포의 효율적인 동원 및 ADCC의 활성화를 지지하도록 할 수 있다. 사실상, 인간 PBMC의 존재하에, R3Mab는 OPM2 및 KMS11 세포의 세포용해를 매개하지만, RT112 또는 UMUC-14 방광암 세포의 세포용해는 매개하지 않는다. 또한, Fc γR에 결합할 수 없는 R3Mab의 DANA 돌연변이체 버전은 생체내에서 KMS11 또는 OPM2 성장에 대한 효과가 없으나, 여전히 R3Mab와 유사하게 RT112 및 UMUC-14 종양의 성장을 저해하였다. 이들 데이터는 함께 R3Mab가 항-종양 활성의 이중 메커니즘을 갖는다는 것을 나타낸다: (a) 보다 낮은 표면 수준의 WT 또는 돌연변이체 FGFR3을 발현하는 세포에서, 이는 리간드-의존성 또는 구성적 신호전달을 차단하고; (b) 상대적으로 높은 표면 FGFR3 수준을 발현하는 세포에서, 이는 ADCC를 유도한다.

[0717] 본 발명자들의 결과는 또한 몇몇 새로운 의문을 제기하였다. 첫째, 이 연구에서 시험된 방광암 세포주가 R3Mab에 가변 감수성을 나타내는 이유가 알려져 있지 않다. 표적화된 치료에서 통상적인 이러한 차등적 반응은 개별 종양의 독특한 유전자 구성을 반영하는 것일 수 있다. 사실상, Her2-양성 유방암 세포는 항-EGFR 항체에 반응하여 다양한 암 세포와 마찬가지로 (49), 항-Her2 항체에 대해 가변 감수성을 나타낸다 (48). 이와 관련하여,

WT 및 돌연변이체 FGFR3으로 방광암에 대한 추가의 생체내 모델을 개발하는 것이 동물에서 FGFR3 분자에 대한 감수성을 평가하기 위해 조속히 요구된다. 또한, 예상되는 바이오마커의 설명은 FGFR3-표적화된 치료가 가장 적절하게 이로울 수 있는 환자를 확인하는 것을 도울 수 있다. 둘째로, R3Mab가 본 발명자들이 조사한 모델에서 종양 회귀를 유도하지 않았기 때문에, 이후의 연구는 R3Mab가 확립된 치료제와 협력할 수 있는지 조사하여야 했다.

[0718] 결론적으로, 본 발명자들의 발견은 WT 및 돌연변이체 FGFR3 둘 모두가 방광암 성장에 중요하다는 것을 밝혀냈으며, 이에 따라 이 수용체의 생체내 종양원성 관련성을 혈액에서 상피 악성종양으로 확대시켰다. 또한, 본 발명자들의 결과는 WT 및 돌연변이체 FGFR3 둘 모두가 리간드 결합, 수용체 이량체화 및 신호전달을 차단하는 능력, 및 ADCC에 의해 종양 세포 용해를 증진시키는 능력을 합하여 전장 항체로 종양에서 효과적으로 표적화될 수 있다는 것을 입증하였다. 이들 결과는 이 수용체와 연관된 다양한 악성종양에서 항체-기재의 FGFR3-표적화된 치료를 조사하기 위한 강력한 이유를 제공한다.

[0719] 부분 참고문헌 목록

1. Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149.
2. L'Hote, C.G., and Knowles, M.A. 2005. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 304:417-431.
3. Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:233-247.
4. Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahim, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
5. Grose, R., and Dickson, C. 2005. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179-186.
6. Chang, H., Stewart, A.K., Qi, X.Y., Li, Z.H., Yi, Q.L., and Trudel, S. 2005. Immunohistochemistry accurately predicts FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in multiple myeloma. *Blood* 106:353-355.
7. Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16:260-264.
8. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., et al. 2003. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101:4569-4575.
9. Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Avet-Loiseau, H. 2002. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 100:1579-1583.
10. Pollett, J.B., Trudel, S., Stern, D., Li, Z.H., and Stewart, A.K. 2002. Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance. *Blood* 100:3819-3821.

[0720]

11. Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Larde, C., Caillault, A., Diez de Medina, S.G., Cappellen, D., Graff, G., Thiery, J.P., Chopin, D., Ricol, D., et al. 2006. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 27:740-747.
12. Agazie, Y.M., Movilla, N., Ischenko, I., and Hayman, M.J. 2003. The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene* 22:6909-6918.
13. Ronchetti, D., Greco, A., Compasso, S., Colombo, G., Dell'Era, P., Otsuki, T., Lombardi, L., and Neri, A. 2001. Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. *Oncogene* 20:3553-3562.
14. Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuchl, W.M., and Bergsagel, P.L. 2001. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 97:729-736.
15. Plowright, E.E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D.L., Branch, D.R., Hawley, R.G., and Stewart, A.K. 2000. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood* 95:992-998.
16. Chen, J., Williams, I.R., Lee, B.H., Duclos, N., Huntly, B.J., Donoghue, D.J., and Gilliland, D.G. 2005. Constitutively activated FGFR3 mutants signal through PLCgamma-dependent and -independent pathways for hematopoietic transformation. *Blood* 106:328-337.
17. Li, Z., Zhu, Y.X., Plowright, E.E., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Patterson, B., Hawley, T.S., Hawley, R.G., and Stewart, A.K. 2001. The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells. *Blood* 97:2413-2419.
18. Trudel, S., Ely, S., Farooqi, Y., Affer, M., Robbiani, D.F., Chesi, M., and Bergsagel, P.L. 2004. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* 103:3521-3528.
19. Trudel, S., Li, Z.H., Wei, E., Wiesmann, M., Chang, H., Chen, C., Reece, D., Heise, C., and Stewart, A.K. 2005. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 105:2941-2948.

[0721]

20. Chen, J., Lee, B.H., Williams, I.R., Kutok, J.L., Mitsiades, C.S., Duclos, N., Cohen, S., Adelsperger, J., Okabe, R., Coburn, A., et al. 2005. FGFR3 as a therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 24:8259-8267.
21. Paterson, J.L., Li, Z., Wen, X.Y., Masih-Khan, E., Chang, H., Pollett, J.B., Trudel, S., and Stewart, A.K. 2004. Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol* 124:595-603.
22. Grand, E.K., Chase, A.J., Heath, C., Rahemtulla, A., and Cross, N.C. 2004. Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074. *Leukemia* 18:962-966.
23. Gomez-Roman, J.J., Saenz, P., Molina, M., Cuevas Gonzalez, J., Escuredo, K., Santa Cruz, S., Junquera, C., Simon, L., Martinez, A., Gutierrez Banos, J.L., et al. 2005. Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clin Cancer Res* 11:459-465.
24. Tomlinson, D.C., Baldo, O., Harnden, P., and Knowles, M.A. 2007. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 213:91-98.
25. van Rhijn, B.W., Montironi, R., Zwarthoff, E.C., Jobsis, A.C., and van der Kwast, T.H. 2002. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol* 198:245-251.
26. Tomlinson, D.C., Hurst, C.D., and Knowles, M.A. 2007. Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene* 26:5889-5899.
27. Martinez-Torrecuadrada, J., Cifuentes, G., Lopez-Serra, P., Saenz, P., Martinez, A., and Casal, J.I. 2005. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clin Cancer Res* 11:6280-6290.
28. Martinez-Torrecuadrada, J.L., Cheung, L.H., Lopez-Serra, P., Barderas, R., Canamero, M., Ferreiro, S., Rosenblum, M.G., and Casal, J.I. 2008. Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7:862-873.
29. Ornitz, D.M., and Leder, P. 1992. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* 267:16305-16311.

[0722]

30. d'Avis, P.Y., Robertson, S.C., Meyer, A.N., Bardwell, W.M., Webster, M.K., and Donoghue, D.J. 1998. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type I. *Cell Growth Differ* 9:71-78.
31. Adar, R., Monsonogo-Ornan, E., David, P., and Yayon, A. 2002. Differential activation of cysteine-substitution mutants of fibroblast growth factor receptor 3 is determined by cysteine localization. *J Bone Miner Res* 17:860-868.
32. Knowles, M.A. 2008. Novel therapeutic targets in bladder cancer: mutation and expression of FGF receptors. *Future Oncol* 4:71-83.
33. Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J., and Ornitz, D.M. 1996. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 13:233-237.
34. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., and Mohammadi, M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98:641-650.
35. Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., Raucci, A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Yayon, A., Basilico, C., Linhardt, R.J., Schlessinger, J., and Mohammadi, M. 2004. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:935-940.
36. Jebar, A.H., Hurst, C.D., Tomlinson, D.C., Johnston, C., Taylor, C.F., and Knowles, M.A. 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-5225.
37. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.
38. Adams, G.P., and Weiner, L.M. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157.
39. Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W.P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W.Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., et al. 2005. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174:817-826.
40. Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P., and Radvanyi, F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23:18-20.

[0723]

41. Qiu, W.H., Zhou, B.S., Chu, P.G., Chen, W.G., Chung, C., Shih, J., Hwu, P., Yeh, C., Lopez, R., and Yen, Y. 2005. Over-expression of fibroblast growth factor receptor 3 in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11:5266-5272.
42. Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K., and Eckhardt, F. 2008. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1494-1508.
43. Woenckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., Pfeifer, M., Wild, P., Bettstetter, M., Wuensch, P., Blaszyk, H., Hartmann, A., et al. 2006. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol* 210:192-204.
44. Xin, X., Abrams, T.J., Hollenbach, P.W., Rendahl, K.G., Tang, Y., Oei, Y.A., Embry, M.G., Swinarski, D.E., Garrett, E.N., Pryer, N.K., et al. 2006. CHIR-258 is efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic multiple myeloma model in mice. *Clin Cancer Res* 12:4908-4915.
45. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.
46. Trudel, S., Stewart, A.K., Rom, E., Wei, E., Li, Z.H., Kotzer, S., Chumakov, I., Singer, Y., Chang, H., Liang, S.B., et al. 2006. The inhibitory anti-FGFR3 antibody, PRO-001, is cytotoxic to t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* 107:4039-4046.
47. Gozlan, H., and Ben-Ari, Y. 1995. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol Sci* 16:368-374.
48. Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., and Ullrich, A. 1989. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-1172.
49. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J.D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. 1984. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 44:1002-1007.
50. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K., and French, D.M. 2008. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res* 68:5086-5095.

[0724]

51. Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinavar, F., and Slamon, D. 1999. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18:2241-2251.
52. Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. 2004. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-1093.
53. Liang, W.C., Dennis, M.S., Stawicki, S., Chanthery, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A.W., Wu, X., et al. 2007. Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366:815-829.
54. Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
55. Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C., and Fuh, G. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338:299-310.
56. Otwinowski, Z.a.M., W. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276:307-326.
57. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:458-464.
58. Emsley, P., and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126-2132.
59. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255.

[0725]

[0726]

전술된 발명이 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 설명 및 실시예로서 약간 상세하게 기재되었지만, 상기 기재 및 실시예가 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

도면1a

[illegible][illegible]

도면1b

[illegible][illegible]

도면1c

클론 #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
184.6	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58	S	A	S	S	L	A	S
184.6.62	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.21	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.49	G	A	S	T	L	A	S
184.6.51	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.52	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.92	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54S	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54G	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54A	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54Q	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58.N54S	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54G	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54A	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54Q	S	A	S	S	L	A	S
184.6.1.NS	S	A	S	F	L	Y	S
D30E							

클론 #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
184.6	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.1	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.62	Q	Q	T	Y	T	T	S	L	T
184.6.21	Q	Q	S	Y	T	T	P	L	T
184.6.49	Q	Q	S	A	A	D	P	Y	T
184.6.51	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.52	Q	Q	T	Y	S	A	Q	P	T
184.6.92	Q	Q	S	Y	S	H	Q	S	T
184.6.1.N54S	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54G	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54A	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54Q	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58.N54S	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54G	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54A	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54Q	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.1.NS	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
D30E									



도면2a

클론 184.6.1.N54S

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (서열 132)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVTSLAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKR (서열 133)

클론 184.6.58

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
ARIYPTNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (서열 134)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVTSLAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGAGNPYTFGQGTKVEIKR (서열 135)

클론 184.6.62

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
ARIYPLYGSTHYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (서열 136)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTTSITFGQGTKVEIKR (서열 137)

클론 184.6.1.NS D30E

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (서열 138)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVETSLAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKR (서열 139)

도면2b

클론 1G6

HVR-H1: GYSFTDYNMY (서열 164)
HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 167)
HVR-H3: ASPNYDSSPFAY (서열 170)
HVR-L1: SASSSVSYMH (서열 155)
HVR-L2: TWIYDTSILAS (서열 158)
HVR-L3: QQWTSNPLT (서열 161)

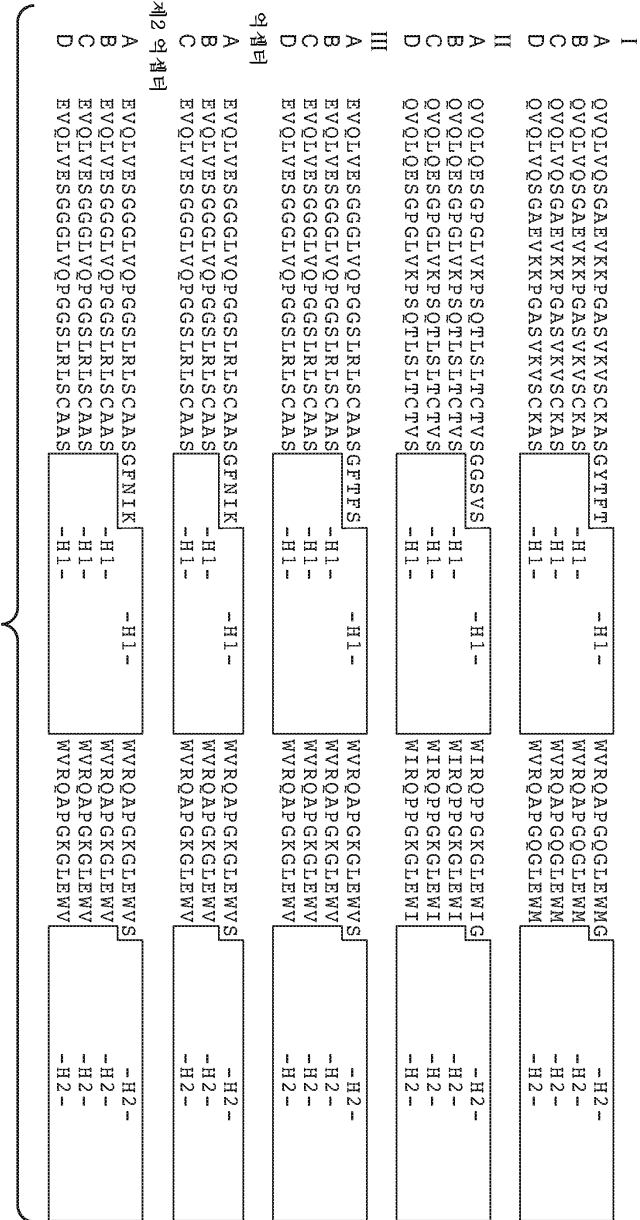
클론 6G1

HVR-H1: GYVFTHYNMY (서열 165)
HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (서열 168)
HVR-H3: ARGQGPDPFDV (서열 171)
HVR-L1: SASSSVSYMH (서열 156)
HVR-L2: RWIYDTSKLAS (서열 159)
HVR-L3: QQWSSYPPT (서열 162)

클론 15B2

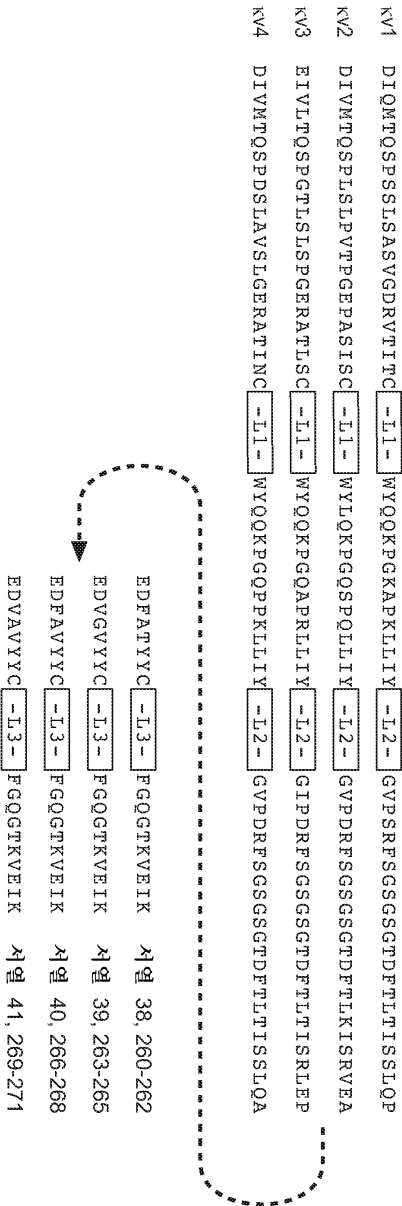
HVR-H1: GYAFTSYNMY (서열 166)
HVR-H2: WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (서열 169)
HVR-H3: ARWGDYDVGAMDY (서열 172)
HVR-L1: LASQTIGTWLA (서열 157)
HVR-L2: LLIYAATSLAD (서열 160)
HVR-L3: QQLYSPPWT (서열 163)

도면3a



3b면도

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSLRS	EDTAVYYCAR	-H3-
B	RVTITADTSTSTAYMELSLRS	EDTAVYYCAR	-H3-
C	RVTITADTSTSTAYMELSLRS	EDTAVYYCAR	-H3-
D	RVTITADTSTSTAYMELSLRS	EDTAVYYCAR	-H3-
II			
A	RVTISVDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCAR	-H3-
B	RVTISVDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCAR	-H3-
C	RVTISVDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCAR	-H3-
D	RVTISVDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCAR	-H3-
III			
A	RFTISRDN	SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
B	RFTISRDN	SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
C	RFTISRDN	SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
D	RFTISRDN	SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
약절터			
A	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCŠR	-H3-
B	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCŠR	-H3-
C	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCŠR	-H3-
제2 약절터			
A	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
B	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
C	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-
D	RFTISÄDT	SKNTÄYLQMSLRAEDTAVYYCAR	-H3-



도면4

도면5

huMab4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(서열 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(서열 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 45)

huMab4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(서열 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(서열 175)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 176)

도면6

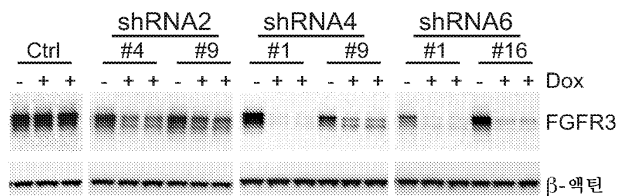
위치 66 (밑줄)에서 변형된 huMab4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(서열 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(서열 177)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 45)

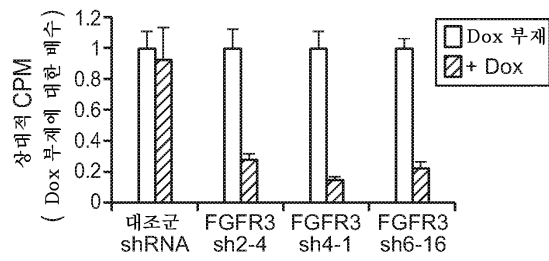
위치 71, 73 및 78 (밑줄)에서 변형된 huMab4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(서열 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (서열 178)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 176)

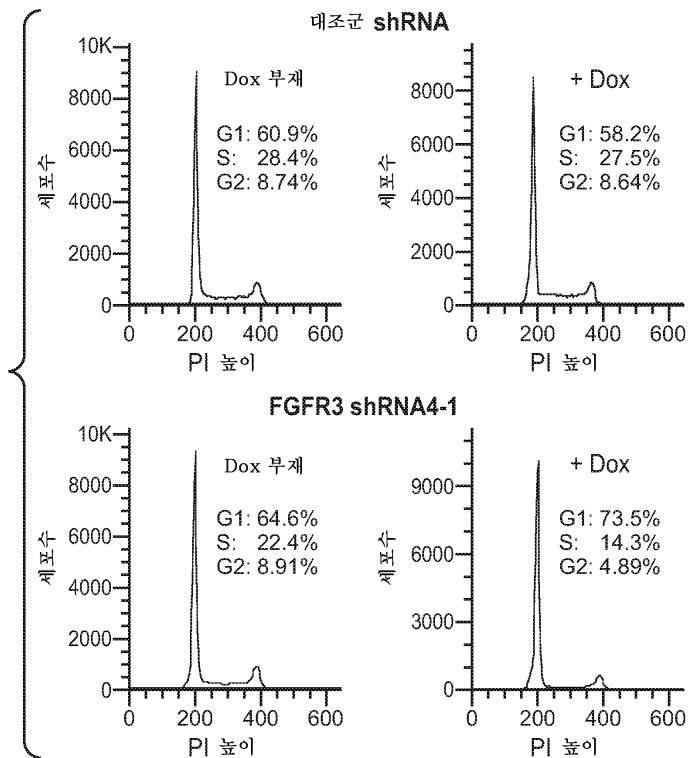
도면7a



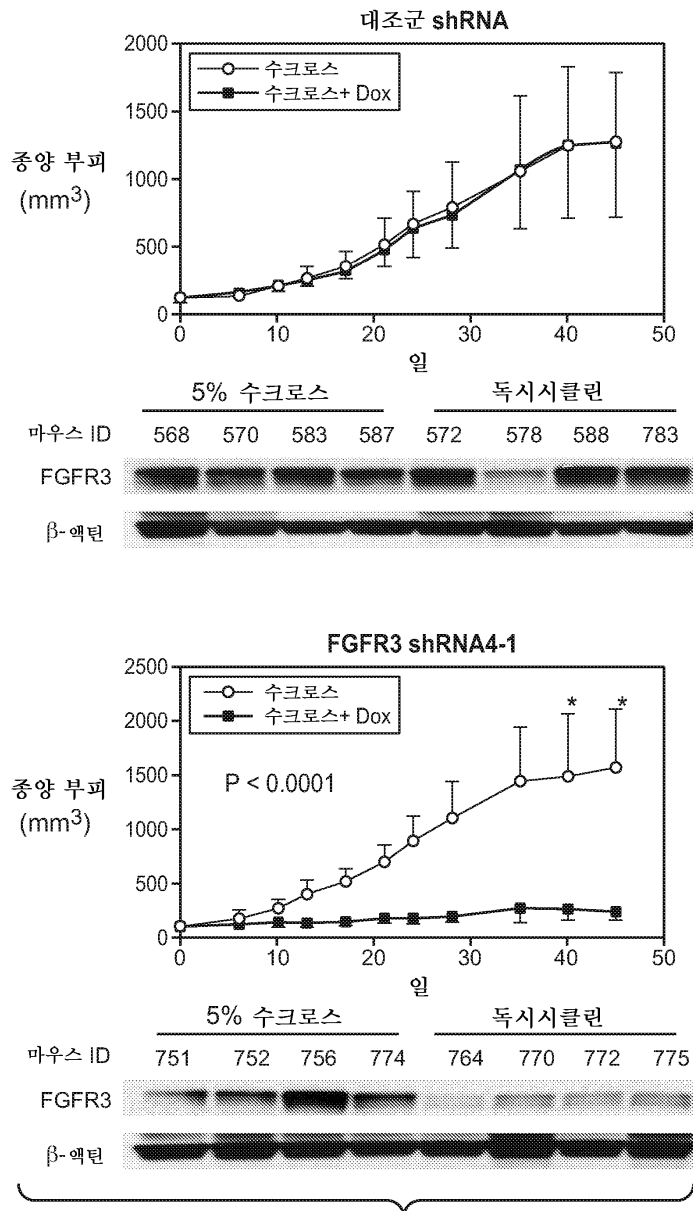
도면7b



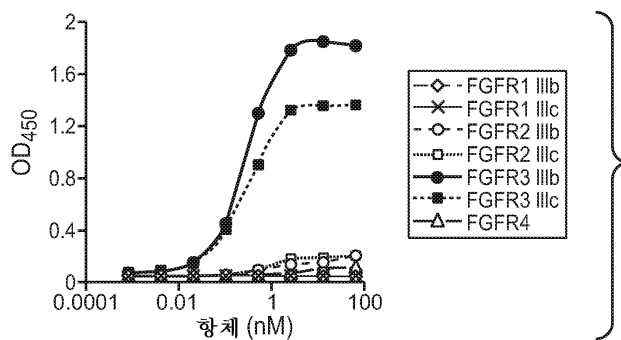
도면7c



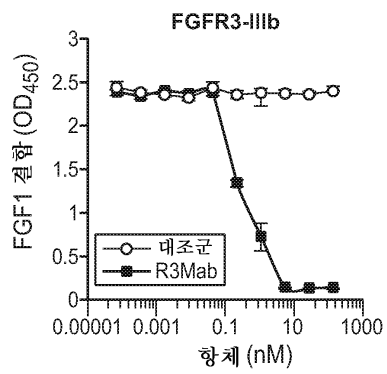
도면7d



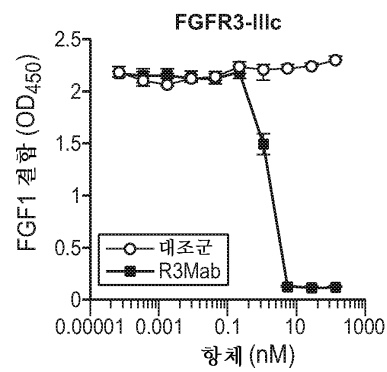
도면8a



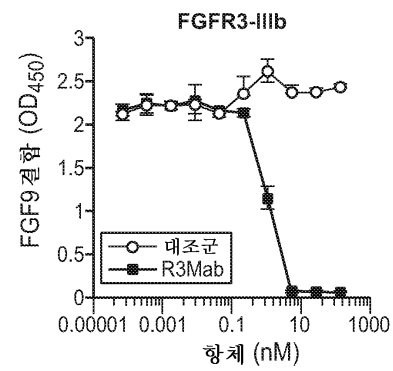
도면8b



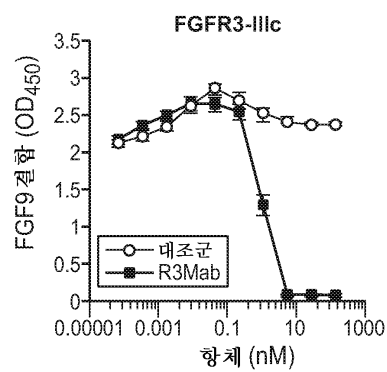
도면8c



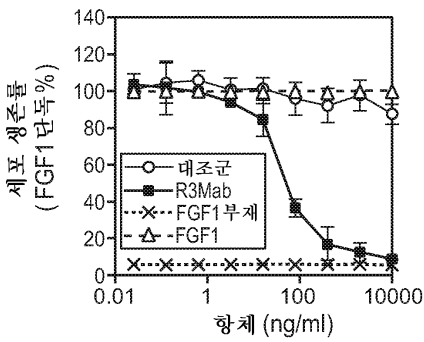
도면8d



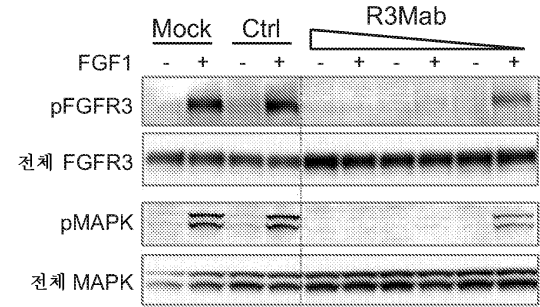
도면8e



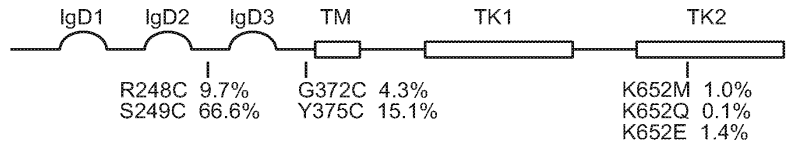
도면9a



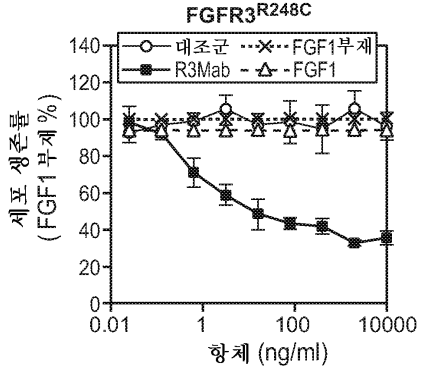
도면9b



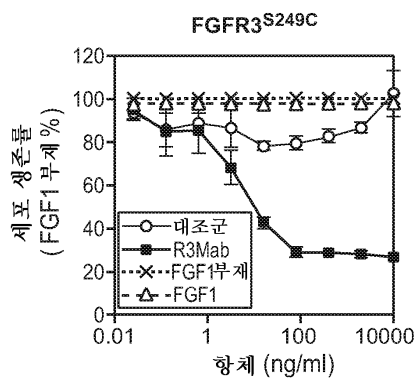
도면9c



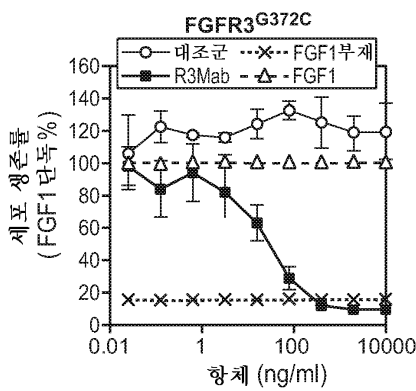
도면9d



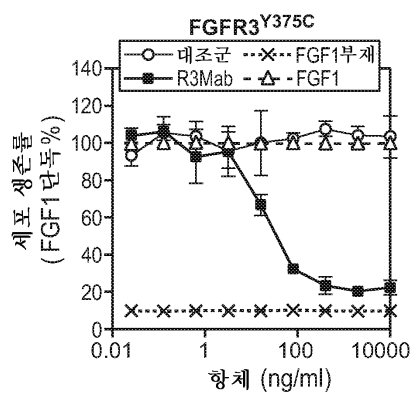
도면9e



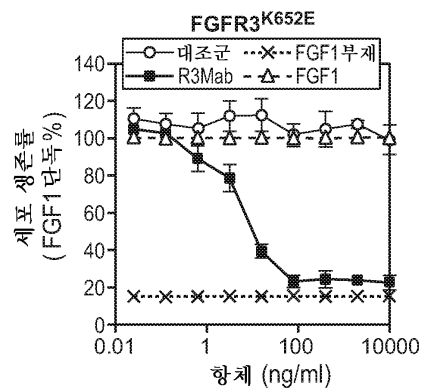
도면9f



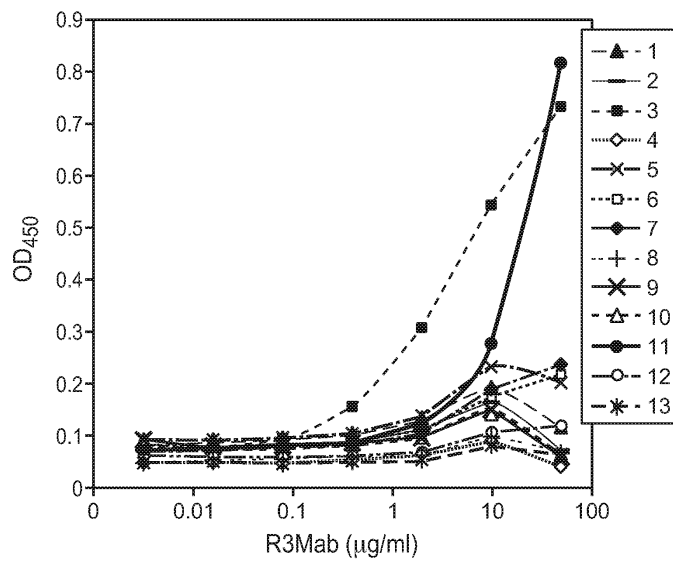
도면9g



도면9h



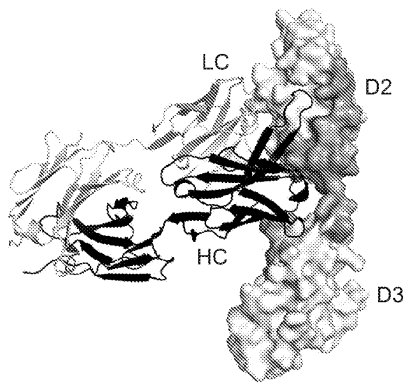
도면10a



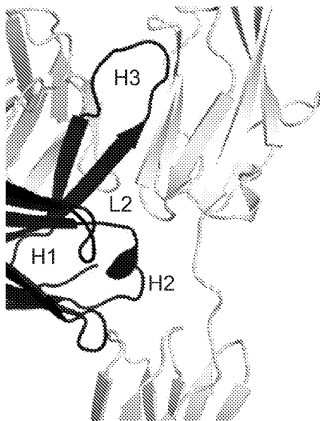
도면10b

164	178	
FGFR3	L A V P A A N T V R F R C P A	펩티드 3
FGFR1	H A V P A A K T V K F K C P S	
269	283	
FGFR3	S D V E F H C K V Y S D A Q P	펩티드 11
FGFR1	S N V E F M C K V Y S D P Q P	

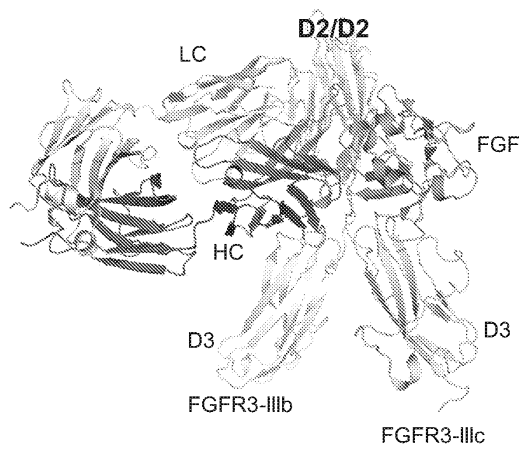
도면10c



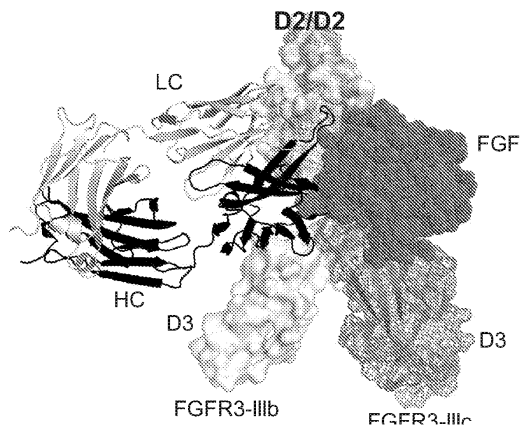
도면10d



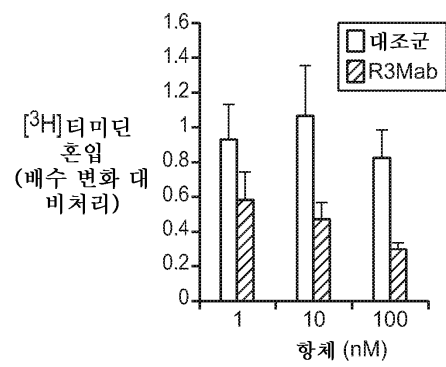
도면10e



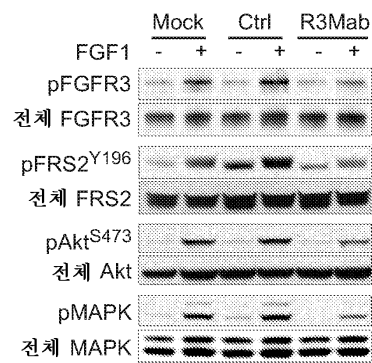
도면10f



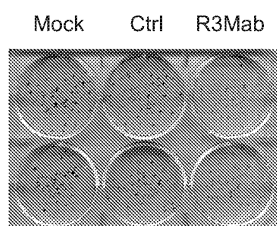
도면11a



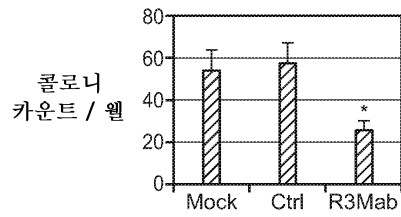
도면11b



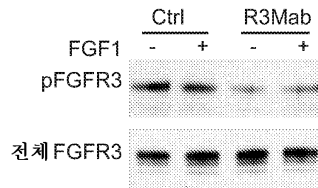
도면11c



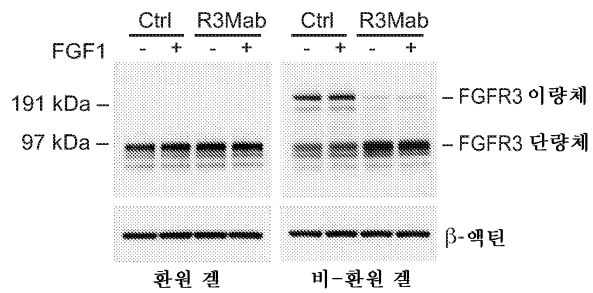
도면11d



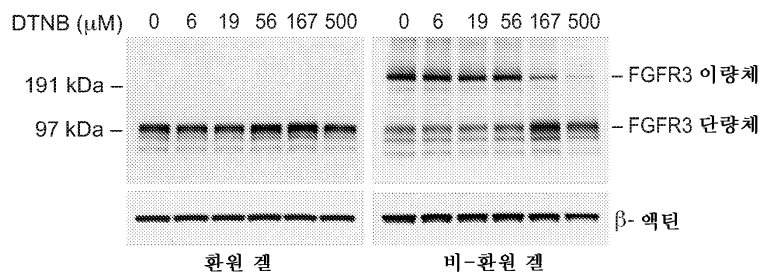
도면11e



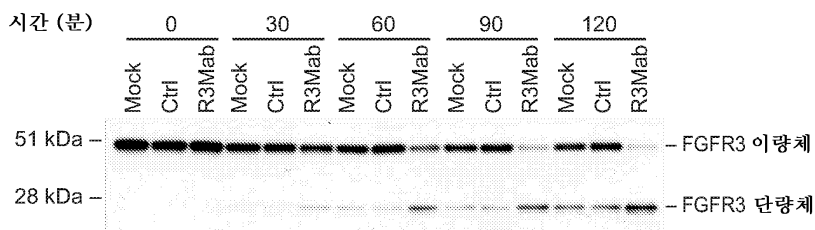
도면12a



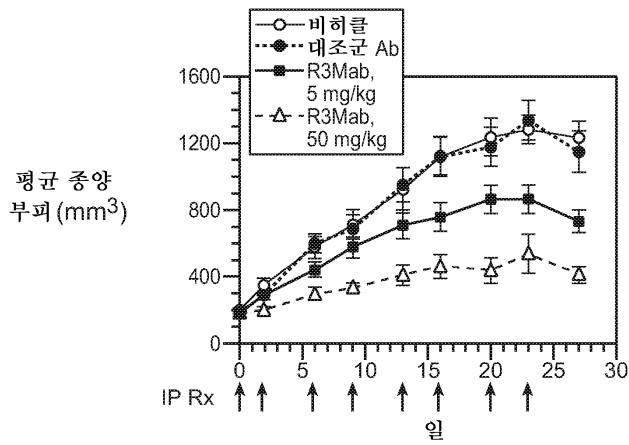
도면12b



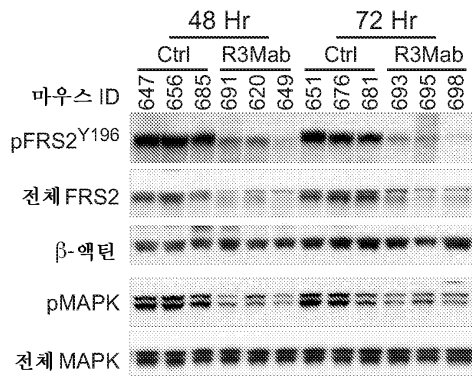
도면12c



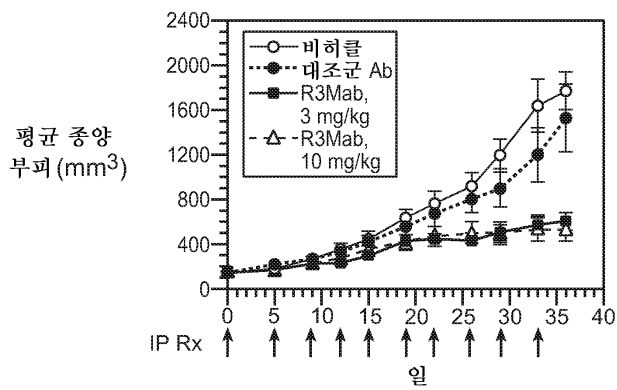
도면13a



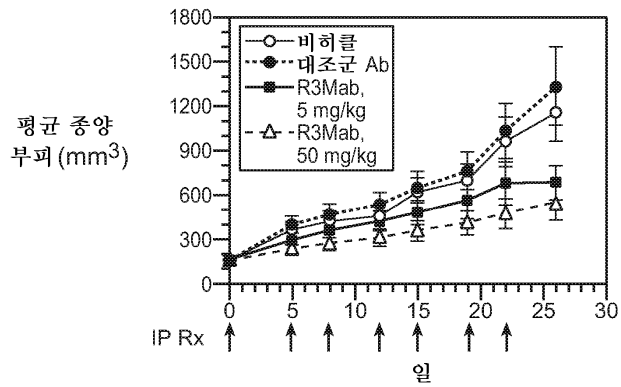
도면13b



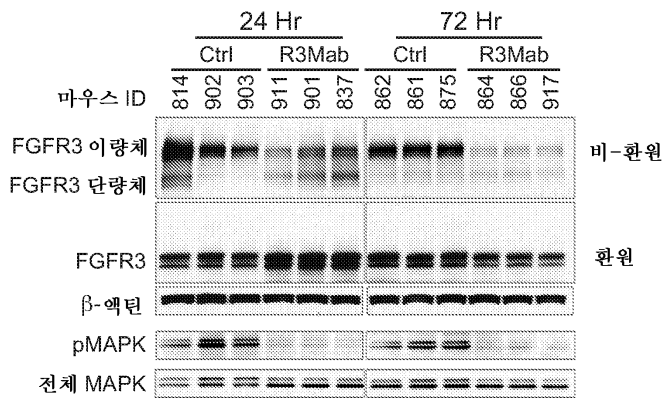
도면13c



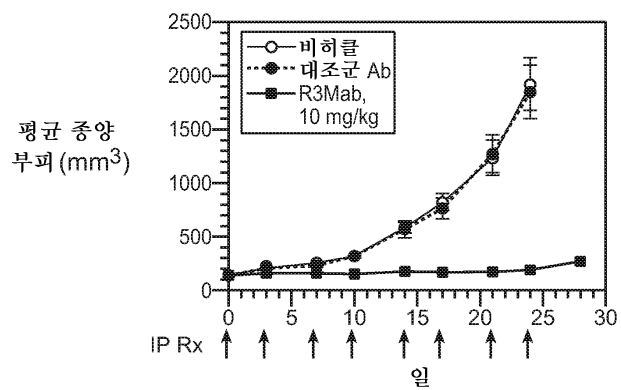
도면13d



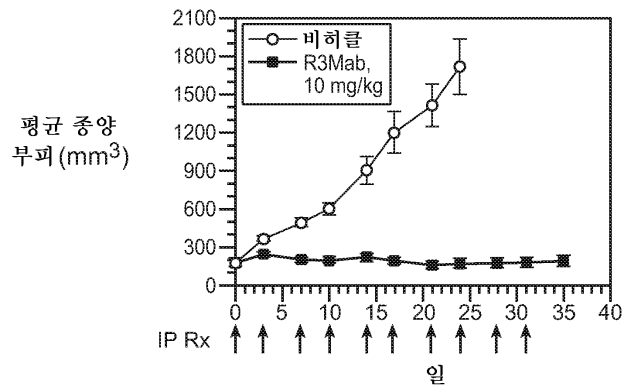
도면13e



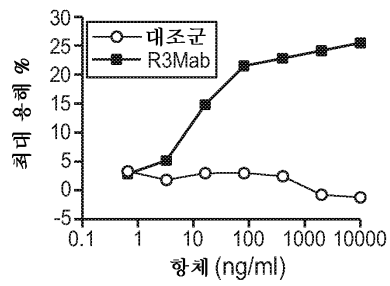
도면14a



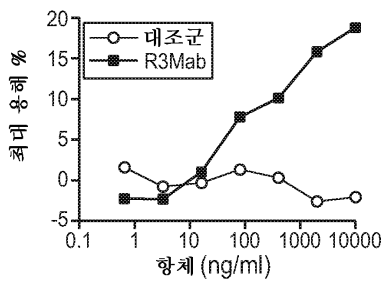
도면14b



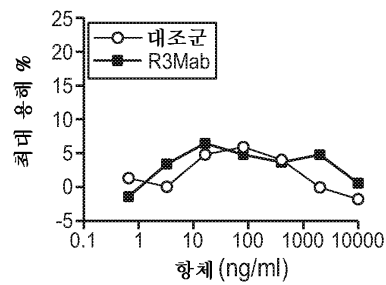
도면14c



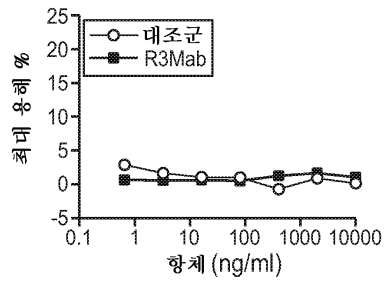
도면14d



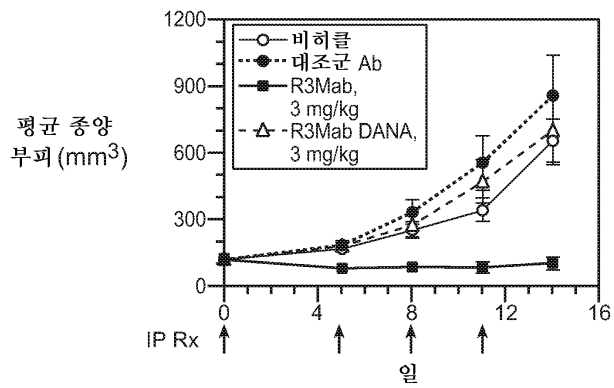
도면14e



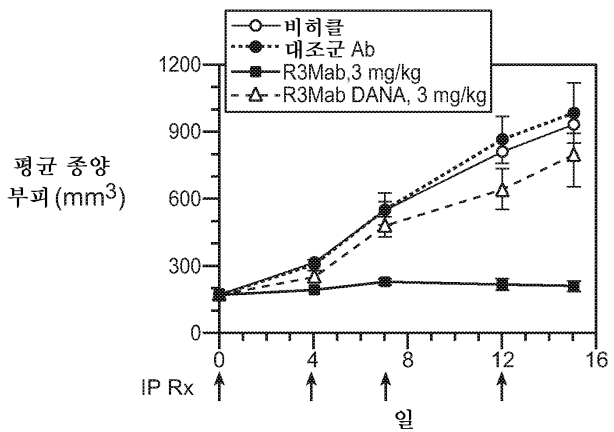
도면14f



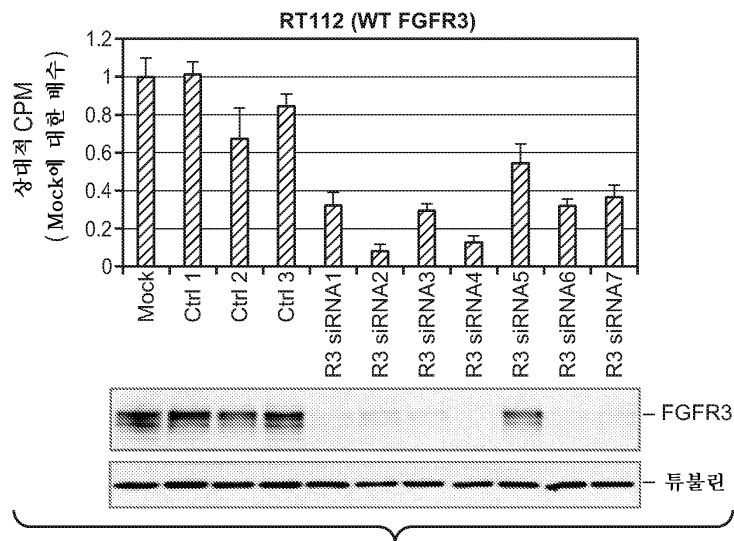
도면14g



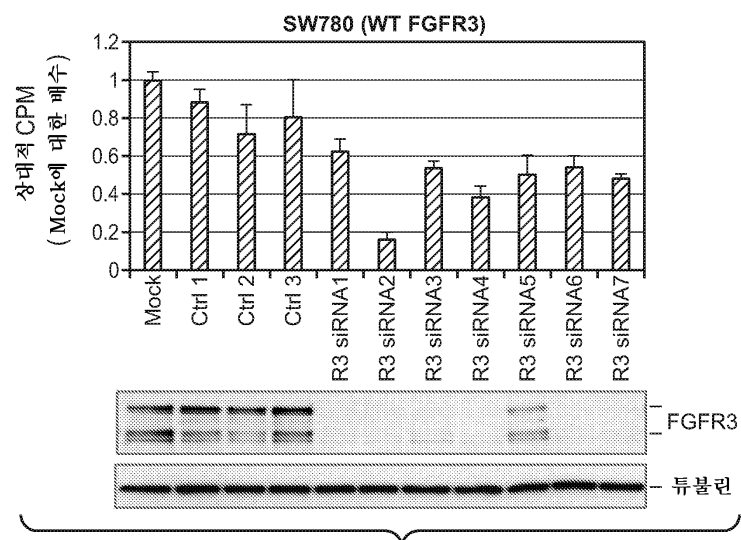
도면14h



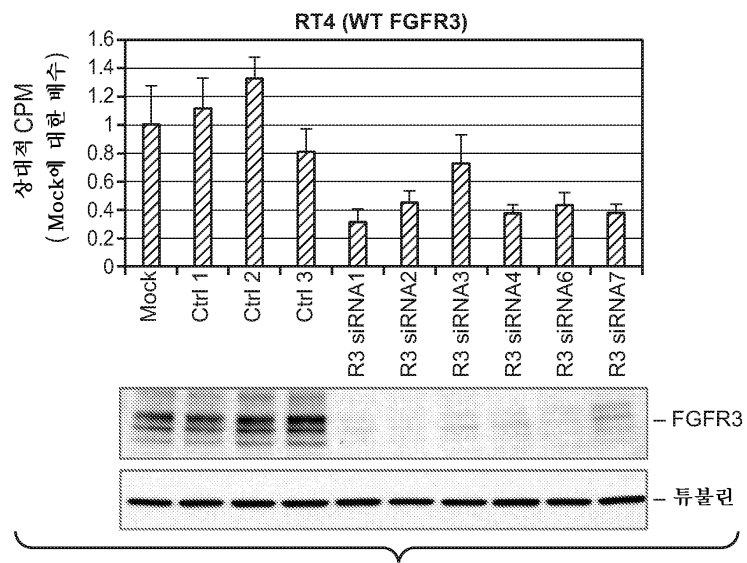
도면15a



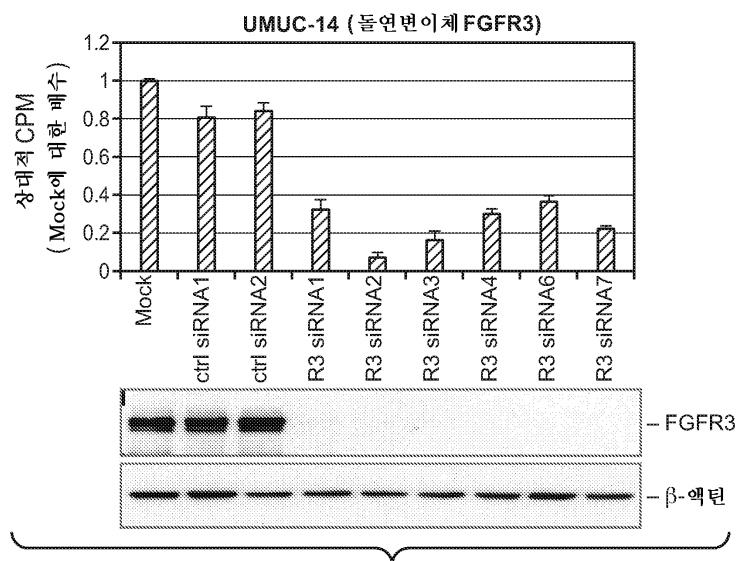
도면15b



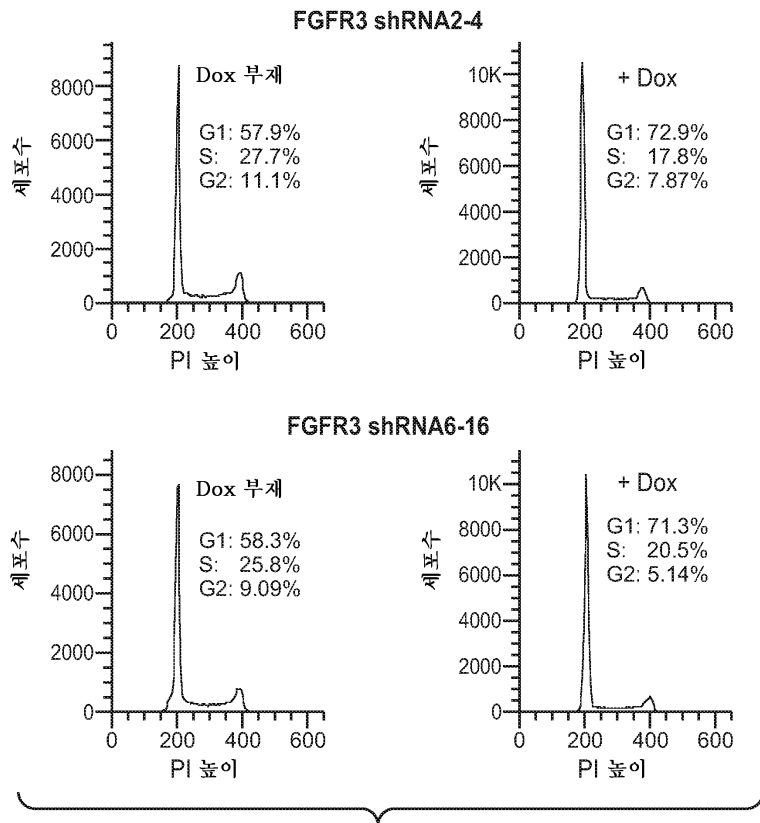
도면15c



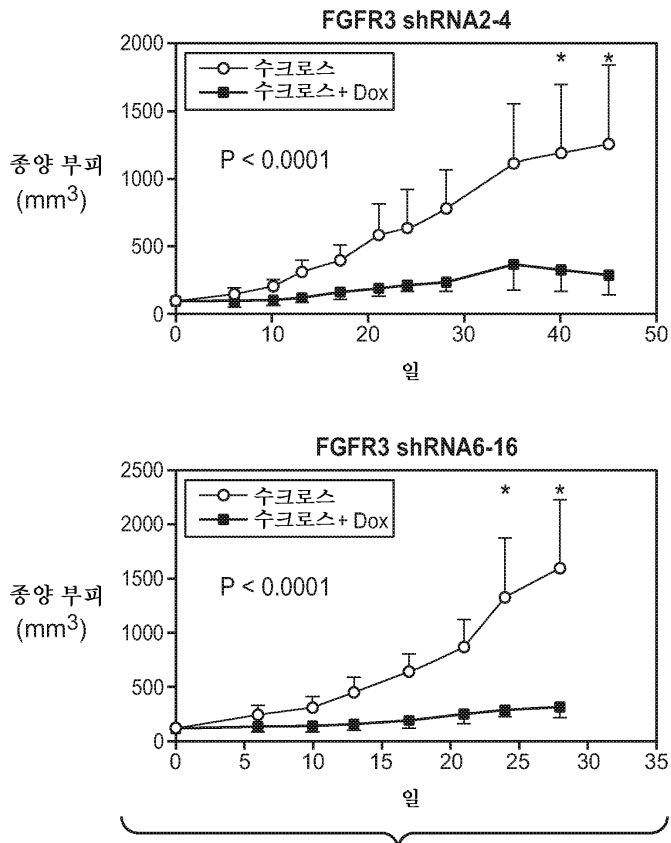
도면15d



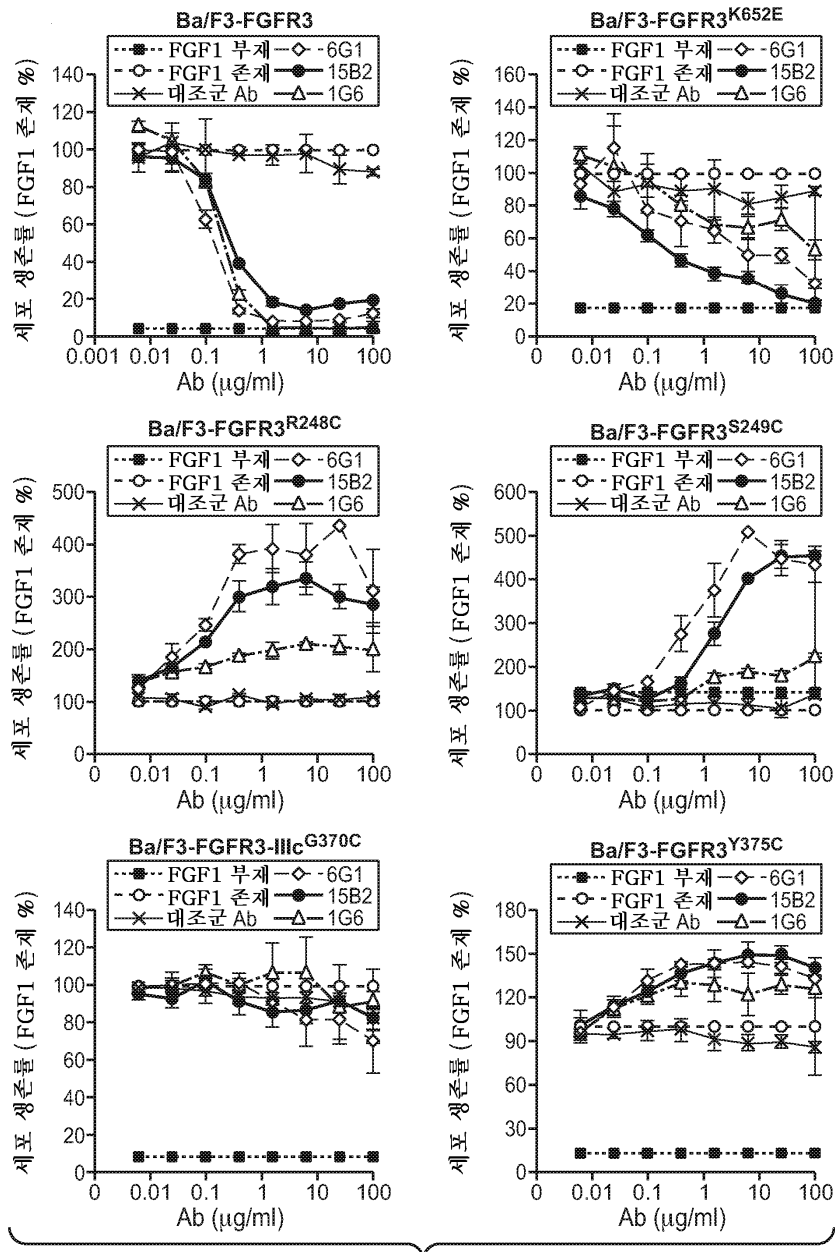
도면16a



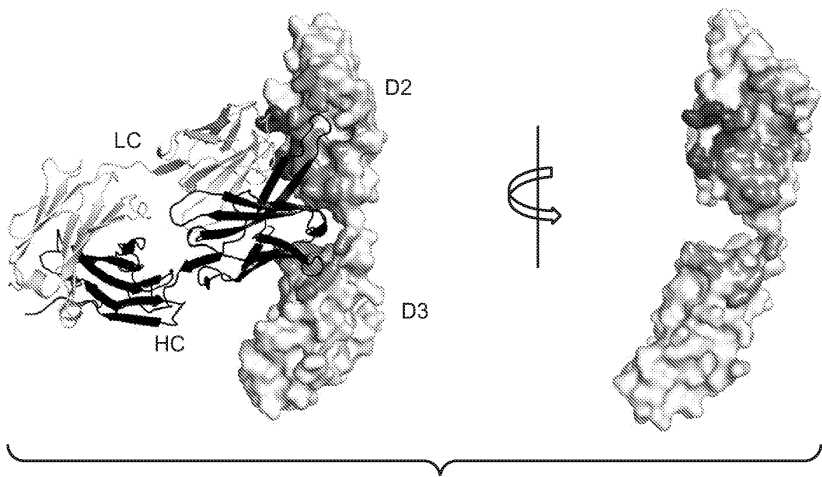
도면16b



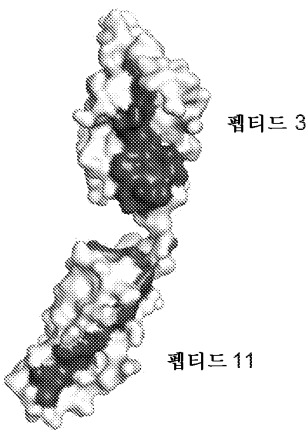
도면17



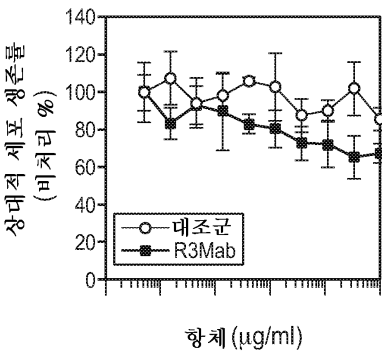
도면18a



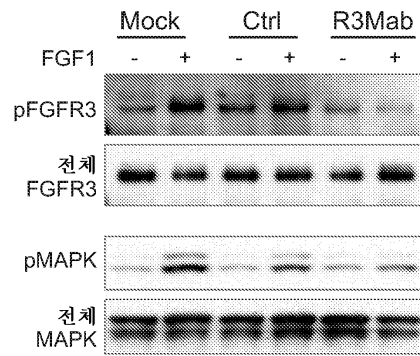
도면18b



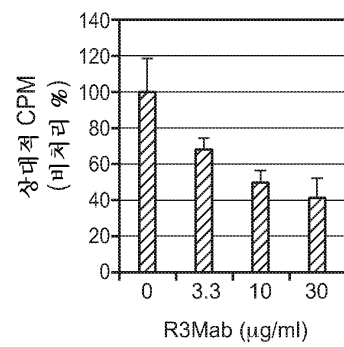
도면19a



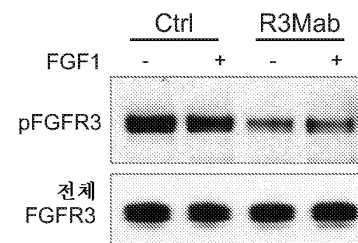
도면19b



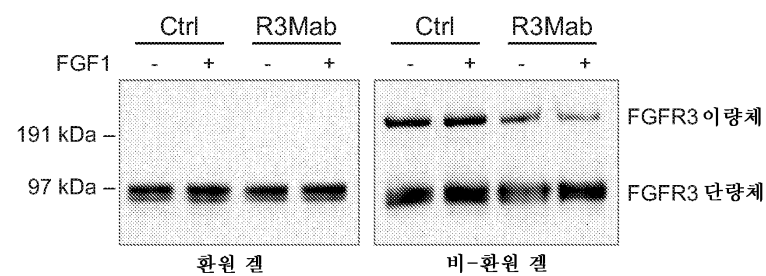
도면19c



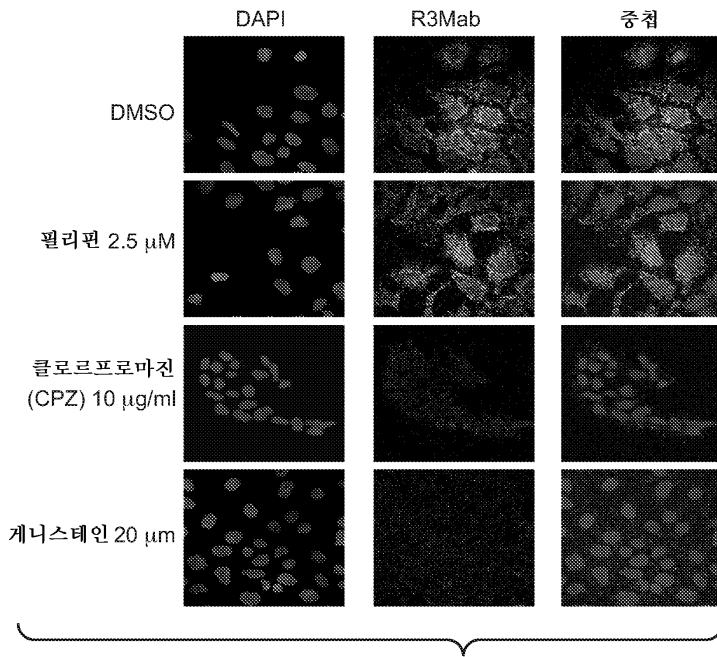
도면19d



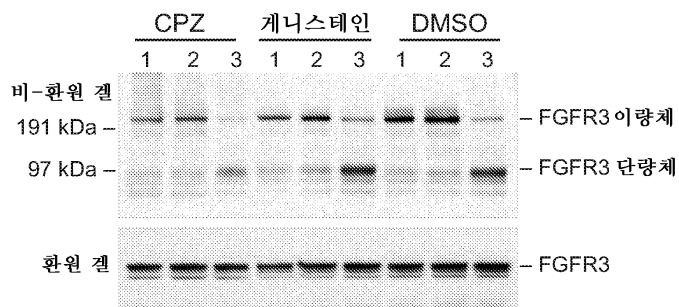
도면19e



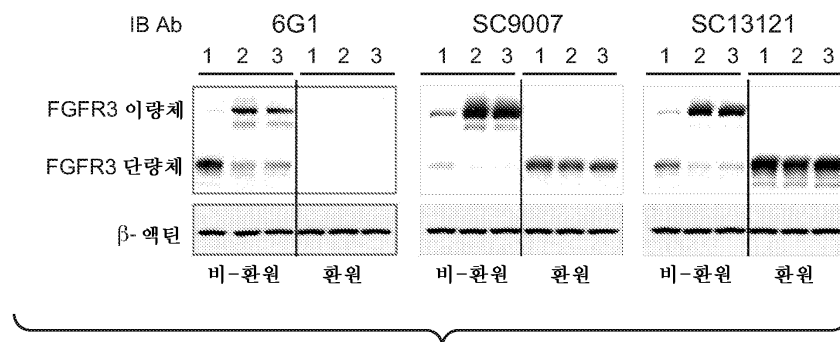
도면20a



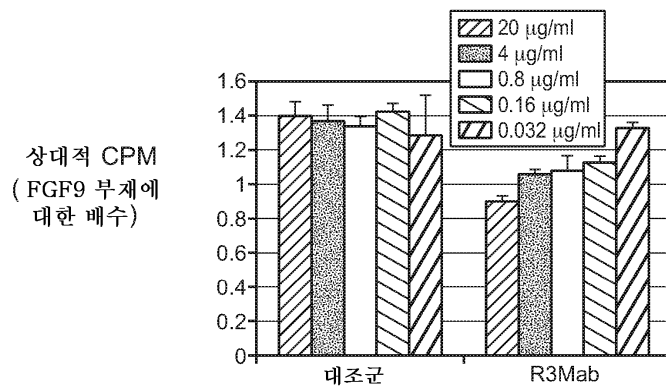
도면20b



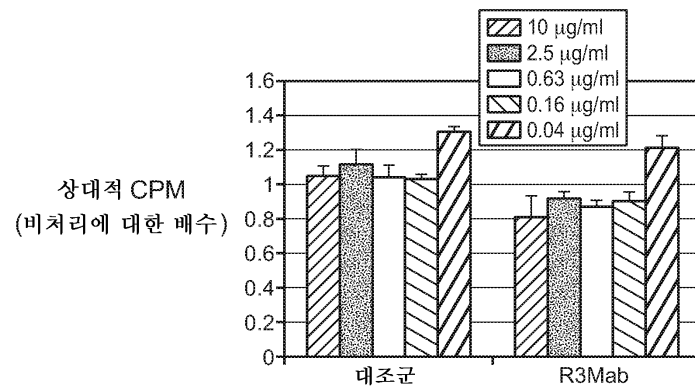
도면21



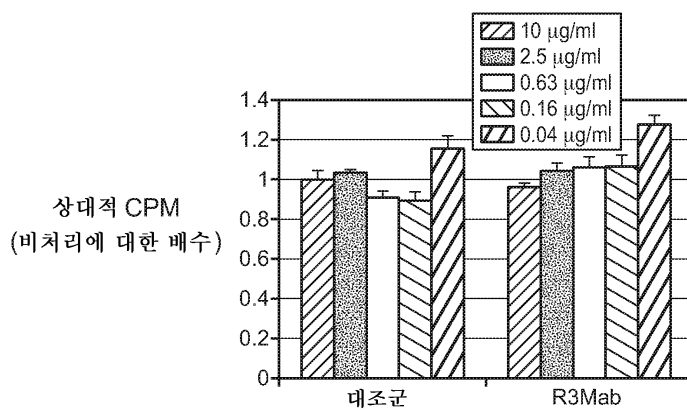
도면22a



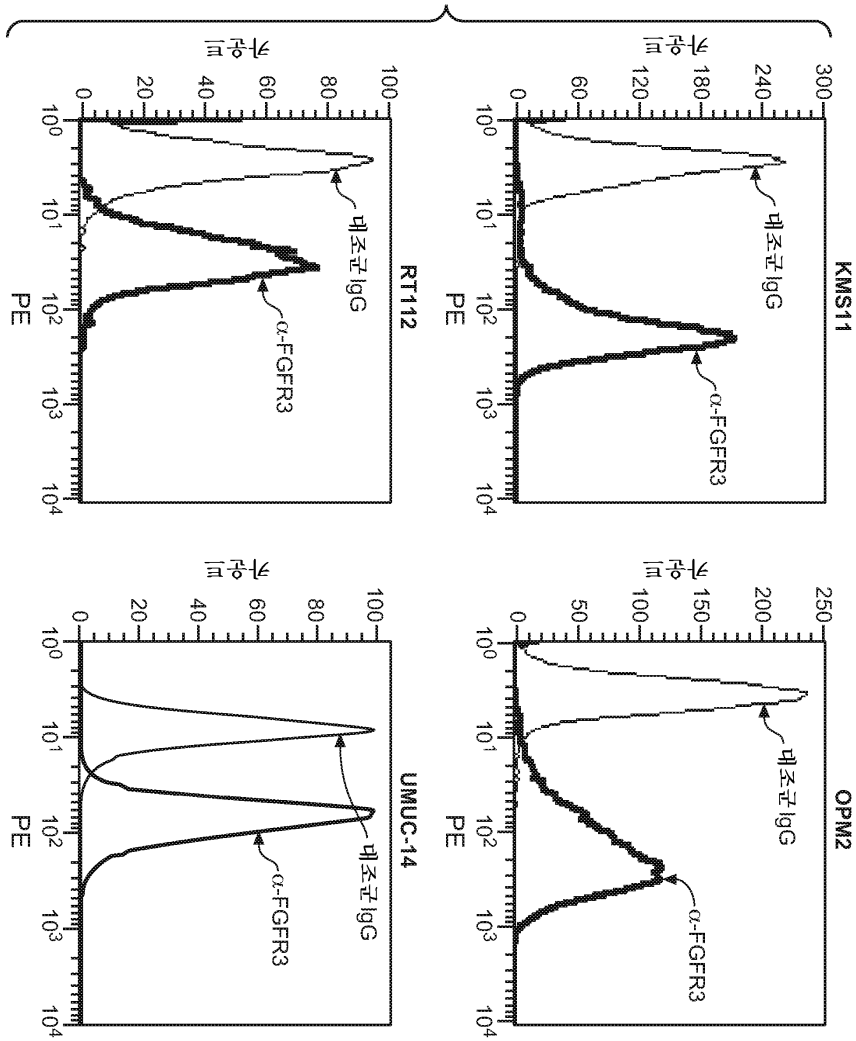
도면22b



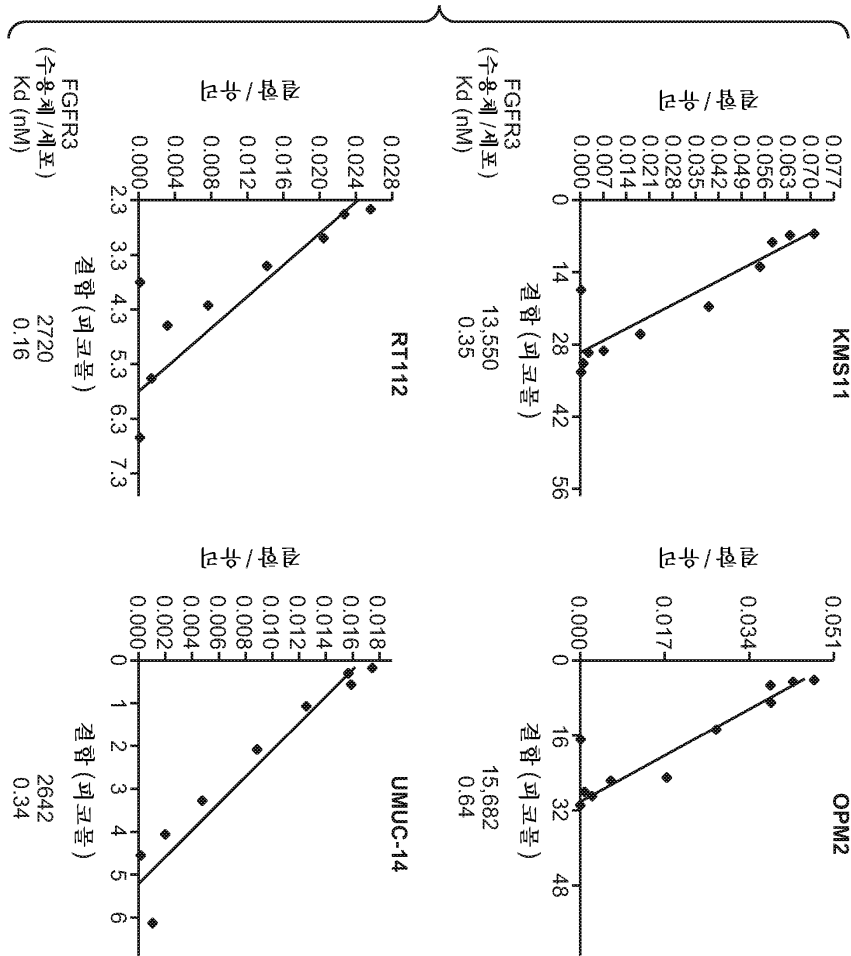
도면22c



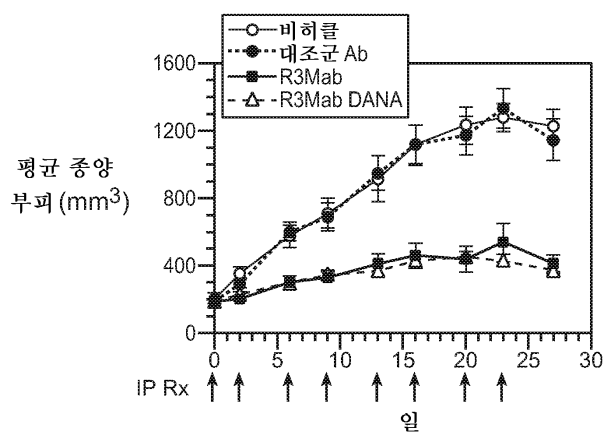
도면23a



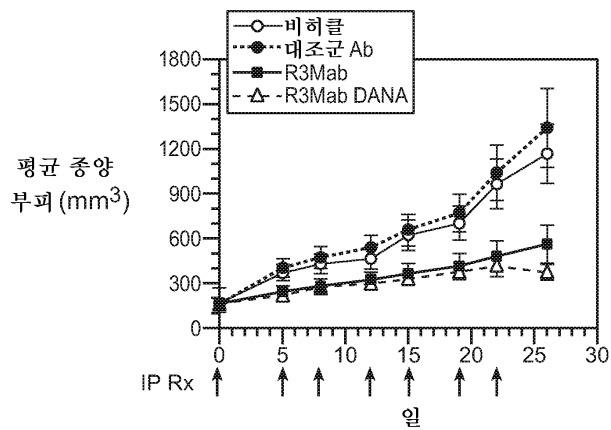
도면23b



도면24a



도면24b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH INC.
ASHKENAZI, Avi
QING, Jing
WIESMANN, Christian
WU, Yan

<120> ANTI-FGFR3 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

<130> P4294R1 WO

<140><141><150> 61/163,222

<151> 2009-03-25

<160> 271

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

<210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 2
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 3
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15
 Val Met Asp Tyr
 20

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 4
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

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

<400> 5
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 6
 Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 7

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 11
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1             5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 12
Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
1             5
<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 13
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1             5             10
<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

peptide"

<400> 14

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ile Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

 20 25

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

 20 25

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

 20 25

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 23

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser

 20 25 30

<210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 24

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

 20 25

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 25

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

 20 25

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 26

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20 25 30

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 32

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20 25 30

<210> 35

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 38
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 39
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221>
 > source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 39
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 42

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 43

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

1 5 10 15

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

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

1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 49

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 50

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 52

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 53

Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Thr

1 5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 55

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 56

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 58

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 59

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 61

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 62

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Val Ile Asp Ile Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 64
 Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 65
 Gln Gln Ser Ala Ala Asp Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 66
 Gly Phe Ser Phe Thr Gly Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 67

Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 68

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

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

<400> 69

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 70
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 71
 Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 72
 Gly Phe Thr Phe Tyr Thr Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 73

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 74

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 76

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 77

Gln Gln Thr Tyr Ser Ala Gln Pro Thr

1 5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 78

Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 79

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 80

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 81

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 82

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 83

Gln Gln Ser Tyr Ser His Gln Ser Thr

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 85

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 86

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 88

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 89
 Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

<210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 90
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10
 <210> 91
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 91
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 92
 <211> 20

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"

<400> 92
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1           5           10           15
Val Met Asp Tyr
                20

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"

<400> 93
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
1           5           10

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221>
> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"

<400> 94
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1           5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT

```

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 95

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 96

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 97

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 98

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 100

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 101

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 102

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 103

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 103

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 104

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 105

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 106

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 107

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 108

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 109

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 109

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 110

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 111

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 112

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 113

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 114
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 115
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 115
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 116
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 116
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15
 Val Met Asp Tyr
 20

<210
 > 117
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 117
 Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10
 <210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 118
 Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 119
 Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 120
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 120

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 121

<211> 18

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 121

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 122

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 122

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 123

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 124

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 125

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 126

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 127

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 128

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 128

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 129

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 130

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 131

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 132

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 132

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

<210> 133

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 133

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 134

<

211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 134

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

<210> 135

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 135

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 136

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 136

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr

20 25 30

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

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
 100 105 110
 Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

<210> 137

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 137

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

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

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

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

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

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

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

100

105

<210> 138

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 138

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

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr

100

105

110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

115

120

125

<210> 139

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 139

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln

85 90 95

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

100 105

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 140

Arg Ala Ser Gln Asp Val Glu Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 141

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 142

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 143

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 144

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 144

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 145

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 145

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

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Asp"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Glu" or "Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Ile"

<220><221> VARIANT

```

<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(10)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 146
Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ala Val Ala
1           5           10
<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<220><221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Gly"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

        with respect to the annotation for said position"

<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Tyr"
<220><221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

```

with respect to the annotation for said position"

<400> 147

Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Ser" or "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Tyr" or "Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Ser" or "Thr" or "Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="His" or "Asp" or "Thr" or "Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Pro" or "Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Tyr" or "Leu" or "Pro" or "Gln"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference"

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 148

Gln Gln Gly Thr Gly Ala Gln Ser Thr

1 5

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Thr"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference with respect to the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Tyr" or "Ser" or "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Gly" or "Thr"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 149

Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser

```

1             5             10

<210> 150
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

        peptide"
<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Ala" or "Leu" or "Ser" or "Thr"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="Gln" or "Asp" or "Gly" or "Tyr" or
        "Ser" or "Asn" or "Phe"
<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Asp" or "Gly"
<220><221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace="Phe" or "Thr" or "Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="His" or "Asn" or "Ile"

<220><221> misc_feature
<222> (6)..(11)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 150

```

Gly Arg Ile Tyr Pro Tyr Ala Ala Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400

> 151

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15
 Val Met Asp Tyr
 20

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Asp"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Glu" or "Ser"
 <220><221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace="Ile"
 <220><221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> /replace="Ser"
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> /note="Residues given in the sequence have no preference
 with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 152
 Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 153
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <220><221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /replace="Gly" or "Thr"
 <220><221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Thr" or "Ala"
 <220><221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Gly"
 <220><221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="His" or "Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Gln" or "Tyr" or "Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 153

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 154

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Tyr" or "Ser" or "Gly" or "Ala" or "Gln"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotation for said position"

<400> 154

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 155

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 155

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 156

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 157

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 158

Thr Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Ile Leu Ala Ser
1 5 10

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 159

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5 10

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 160

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5 10

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 161

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 162

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 163

Gln Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Trp Thr

1 5

<210> 164

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 164

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Met Tyr

1 5 10

<210> 165

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 165

Gly Tyr Val Phe Thr His Tyr Asn Met Tyr

1 5 10

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 166

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn Met Tyr

1 5 10

<210> 167

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 167

Trp Ile Gly Tyr Ile Glu Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 168

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 168

Trp Ile Gly Tyr Ile Glu Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 169

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 169

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

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 170

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 170

Ala Ser Pro Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 171

Ala Arg Gly Gln Gly Pro Asp Phe Asp Val

1 5 10

<210> 172

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 172

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

1 5 10

<210> 173

<211> 107

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 173

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 174

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 174

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 175

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 175

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 176

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 177

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 177

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 178

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 178

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

1 5 10 15

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

20

25

30

<210> 179

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 179

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

1

5

10

15

<210> 180

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro

1

5

10

15

<210> 181

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser

1

5

10

15

<210> 182

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro

1

5

10

15

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 183

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 184

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 184

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 185

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 185

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

1 5 10

<210> 186

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 186

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 187

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

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

<400> 187

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 188

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 188

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 189

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 189

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

1 5 10 15

<210> 190

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 190

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 191

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 191

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 192

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 192

gatccccgca tcaagctgcg gcatcattca agagatgatg cgcagcttg atgctttttt 60

ggaaa 65

<210> 193

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 193

gatccctgc acaacctga ctactattca agagatagta gtcgaggttg tgcatttttt 60

ggaaa 65

<210> 194

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 194

gatccccaac ctgcactact acaagattca agagatcttg tagtagtcga ggtttttttt 60

ggaaa 65

<210> 195

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

primer"

<400> 195
gtcagatatc gtktsacmc artctccwgc 30
<210> 196
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 196
gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg 37
<210> 197
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 197
gtcagatatc gtgctgacmc artctcc 27
<210> 198
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 198
gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg 37
<210> 199
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 199
gtacgatatc cagatgacmc artctcc 27

<210> 200
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 200
gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg 37

<210> 201
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 201
tttdakytcc agcttggtac c 21

<210> 202
<211>
> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 202
acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

<210> 203
<211> 14

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 203
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 204
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 204
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 205
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221>
 > source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 205
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 206
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 206

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

1 5 10

<210> 207

<211> 32

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 207

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 208

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 208

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 209

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 209

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

1 5 10

<210> 210

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 210

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 211

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 211

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 212

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 212

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

1 5 10

<210> 213

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 213

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 214

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 214

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 215

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 215

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 216

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 216

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 217

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 217

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 218

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 218

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10

<210> 219

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 219

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 221

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 221

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10

<210> 222

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 222

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

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

20 25 30

<210> 223

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 223

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 224

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 224

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10

<210> 225

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 225

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

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 226

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

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

<400> 226

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 227

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 227

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

1 5 10

<210> 228

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 228

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 229

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 229

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 230

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 230

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

1 5 10

<210> 231

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 231

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 232

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 232

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 233

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 233

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

1 5 10

<210> 234

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 234

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

1	5	10	15
Met	Asn	Ser	Leu
Arg	Ala	Glu	Asp
Thr	Ala	Val	Tyr
Tyr	Cys	Ala	
20	25	30	

<210> 235

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 235

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 236

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 236

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

1	5	10
---	---	----

<210> 237

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 237

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 238

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 238

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 239

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 239

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

1 5 10

<210> 240

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 240

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 241

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 241

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 242

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 242

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

1 5 10

<210> 243

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 243

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 244

<211

> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 244

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 245

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 245

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

1 5 10

<210> 246

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 246

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 247

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 247

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 248

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 248

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

1 5 10

<210> 249

<211> 32

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 249

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 250

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 250

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 251

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 251

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

1 5 10

<210> 252

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 252

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 253

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 254

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 254

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

1 5 10

<210> 255

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 255

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

1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 256

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 257

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 257

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

1 5 10

<210> 258

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 258

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 259

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 259

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 260

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 260

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

1 5 10 15

<210> 261

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 261

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 262

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 263

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 263

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

1 5 10 15

<210> 264

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 264

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

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 265

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 265

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 266

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 266

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

1 5 10 15

<210> 267

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 267

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 268

```

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221
> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 268
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1           5           10
<210> 269
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 269
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1           5           10           15
<210> 270
<211> 32
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polypeptide"
<400> 270
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1           5           10           15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
           20           25           30
<210> 271
<211> 10

```

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 271

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10