



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0013092
(43) 공개일자 2016년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/179 (2013.01)

A61K 38/1825 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7035893

(22) 출원일자(국제) 2014년05월22일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년12월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/039129

(87) 국제공개번호 WO 2014/190147

국제공개일자 2014년11월27일

(30) 우선권주장

61/826,975 2013년05월23일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

파이프 프라임 테라퓨틱스, 인크.

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 투 코포레이트 드라이브

글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 (넘버 2) 리미티드

영국 티더블유8 9지엑스 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드 980

(72) 발명자

멜로빈, 데이빗

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 투 코포레이트 드라이브

베이커, 케빈

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 투 코포레이트 드라이브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 심미성

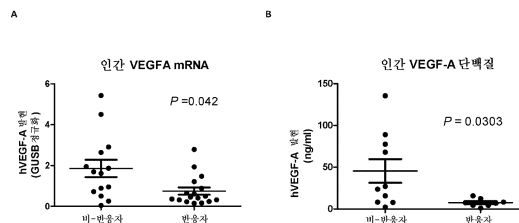
전체 청구항 수 : 총 56 항

(54) 발명의 명칭 암을 치료하는 방법

(57) 요약

섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/50 (2013.01)
G01N 2333/515 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/936,471 2014년02월06일 미국(US)
 61/974,279 2014년04월02일 미국(US)

(72) 발명자

브레난, 토마스

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 투
 코포레이트 드라이브

팬디트, 애런대티, 니르말리니

영국 티더블유8 9지애스 미들섹스 브랜트포드 그레
 이트 웨스트 로드 980

무커지, 비조예시

영국 티더블유8 9지애스 미들섹스 브랜트포드 그레
 이트 웨스트 로드 980

드영, 모리스 피.

영국 티더블유8 9지애스 미들섹스 브랜트포드 그레
 이트 웨스트 로드 980

쿠마르, 라케시

영국 티더블유8 9지애스 미들섹스 브랜트포드 그레
 이트 웨스트 로드 980

명세서

청구범위

청구항 1

치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법이며, 여기서 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 방법.

청구항 2

치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이며,

여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되고,

암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 방법.

청구항 3

대상체로부터 수득된 샘플 내의 FGF2 및 VEGF의 수준을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 샘플 내의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 사용하는 치료가 대상체에게 이로울 수 있다는 것을 나타내는 것인, 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 사용하는 치료가 이로울 수 있는 대상체를 확인하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 mRNA 수준인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF mRNA 수준인 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, mRNA 수준이 정량적 RT-PCR에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 단백질 수준인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF 단백질 수준인 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 단백질 수준이 면역조직화학에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비가 1 초과인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 단독요법으로서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대해 반응성인 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 단독요법으로서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 14

치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법.

청구항 15

치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이며,

여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부는 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정된 것인 방법.

청구항 16

대상체로부터 수득된 샘플 내의 FGF2 및 VEGF의 수준을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 샘플 내의 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 사용하는 치료가 대상체에게 이로울 수 있다는 것을 나타내는 것인, 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 사용하는 치료가 이로울 수 있는 대상체를 확인하는 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 mRNA 수준인 방법.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF mRNA 수준인 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, mRNA 수준이 정량적 RT-PCR에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 20

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 단백질 수준인 방법.

청구항 21

제14항 내지 제16항 및 제20항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF 단백질 수준인 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 단백질 수준이 면역조직화학에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비가 1 미만인 방법.

청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항혈관신생제가 VEGF 길항제인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, VEGF 길항제가 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 26

고형 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 고형 암이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 mRNA 수준인 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF mRNA 수준인 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, mRNA 수준이 정량적 RT-PCR에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 31

제27항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 단백질 수준인 방법.

청구항 32

제27항 또는 제31항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF 단백질 수준인 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 단백질 수준이 면역조직화학에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비가 1 초과인 방법.

청구항 35

제14항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 36

중피종에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 및 파클리탁셀, 카르보플라틴, 도세탁셀, 페메트렉세드, 및 시스플라틴으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 투여하는 것을 포함하는, 중피종을 치료하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 파클리탁셀 및 카르보플라틴을 투여하는 것을 포함하는

방법.

청구항 38

제36항에 있어서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 도세탁셀을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 페메트렉세드, 및 시스플라틴을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 치료제의 투여가 중피종에서 혈관 밀도를 감소시키는 것인 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 중피종이 기준 샘플 또는 세포에서의 FGF2 수준과 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것인 방법.

청구항 42

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 중피종이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것인 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 mRNA 수준인 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF mRNA 수준인 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, mRNA 수준이 정량적 RT-PCR에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 46

제41항 또는 제42항에 있어서, FGF2 수준이 FGF2 단백질 수준인 방법.

청구항 47

제42항 또는 제46항에 있어서, VEGF 수준이 VEGF 단백질 수준인 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 단백질 수준이 면역조직화학에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 49

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비가 1 초과인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 이전에 파조파넵, 베바시주맵, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 및 수니티닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 사용하여 치료된 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 대상체가 VEGF-저항성 암 또는 파조파넵-저항성 암에 걸린 것인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, FGFR1 ECD를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, FGFR1 ECD가 서열 1 내지 4로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, FGFR1 ECD 융합 분자가 FGFR1 ECD 및 융합 파트너를 포함하고, 융합 파트너가 Fc인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, FGFR1 ECD 융합 분자가 서열 5 및 서열 6으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

배경 기술

[0001]

가용성 형태의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1)이 시험관 내에서, 그리고 생체 내에서 종양 세포 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890을 참조한다. 일부 경우에, 표적화되는 암의 유전적 구성에 항암 요법의 효능이 좌우된다.

발명의 내용

[0002]

일부 실시양태에서, 대상체에서 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 암이 대상체에서 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것을 특징으로 하는, 암 치료 방법에서 사용하기 위한 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 제공된다. 추가적인 실시양태에서, 암이 대상체에서 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것을 특징으로 하는, 암 치료 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조에서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 용도가 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택된다.

[0003]

일부 실시양태에서, 치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타낸다.

[0004]

일부 실시양태에서, 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 사용하는 치료가 이로울 수 있는 대상체를 확인하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 취득된 샘플 내의 FGF2 및 VEGF의 수준을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 샘플 내의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준이 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합

분자를 사용하는 치료가 대상체에게 이로울 수 있다는 것을 나타낸다.

- [0005] 일부 실시양태에서, 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 걸린 대상체의 반응성을 예측하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 샘플 내의 FGF2 및 VEGF의 수준을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 샘플 내의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준이 암이 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 반응할 것으로 예측된다는 것을 나타낸다.
- [0006] 일부 실시양태에서, FGF2 수준은 FGF2 mRNA 수준이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준은 VEGF mRNA 수준이다. 일부 실시양태에서, 정량적 RT-PCR에 의해 mRNA 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 정량적 RT-PCR, 마이크로어레이, 디지털 PCT, RNA-Seq, RNase 보호 검정법 (RPA), 노던 블롯, 및 원위치 혼성화 (ISH)로부터 선택된 방법에 의해 mRNA 수준이 결정된다.
- [0007] 일부 실시양태에서, FGF2 수준은 FGF2 단백질 수준이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준은 VEGF 단백질 수준이다. 일부 실시양태에서, 면역조직화학에 의해 단백질 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 면역조직화학, ELISA, 질량 분광법, 역상 단백질 어레이 (RPPA), 항체 어레이, 나노-면역 검정법, 웨스턴 블롯, 및 모세관 단백질 분석 검정법으로부터 선택된 방법에 의해 단백질 수준이 결정된다.
- [0008] 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1을 초과한다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1.1을 초과한다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1.2를 초과한다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1.3을 초과한다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1.4를 초과한다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1.5를 초과한다.
- [0009] 일부 실시양태에서, 암은 단독요법으로서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대해 반응성이다. 일부 실시양태에서, 단독요법으로서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 대상체에게 투여된다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 위장 기질 종양이다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 대상체에서 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택된다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 투여하는 것을 포함하는, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 사용하는 치료가 이로울 수 있는 대상체를 확인하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 샘플 내의 FGF2 및 VEGF의 수준을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 샘플 내의 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준이 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 사용하는 치료가 대상체에게 이로울 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제에 대한 암에 걸린 대상체의 반응성을 예측하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 샘플 내의 FGF2 및 VEGF의 수준을 결정하는 것을 포함하며,

여기서 샘플 내의 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준이 암이 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제를 사용하는 치료에 반응할 것으로 예측된다는 것을 나타낸다.

[0015] 일부 실시양태에서, FGF2 수준은 FGF2 mRNA 수준이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준은 VEGF mRNA 수준이다. 일부 실시양태에서, 정량적 RT-PCR에 의해 mRNA 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 정량적 RT-PCR, 마이크로어레이, 디지털 PCT, RNA-Seq, RNase 보호 검정법 (RPA), 노던 블롯, 및 원위치 혼성화 (ISH)로부터 선택된 방법에 의해 mRNA 수준이 결정된다.

[0016] 일부 실시양태에서, FGF2 수준은 FGF2 단백질 수준이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준은 VEGF 단백질 수준이다. 일부 실시양태에서, 면역조직화학에 의해 단백질 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 면역조직화학, ELISA, 질량 분광법, 역상 단백질 어레이 (RPPA), 항체 어레이, 나노-면역 검정법, 웨스턴 블롯, 및 모세관 단백질 분석 검정법으로부터 선택된 방법에 의해 단백질 수준이 결정된다.

[0017] 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1 미만이다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 0.9 미만이다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 0.8 미만이다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 0.7 미만이다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 0.6 미만이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 위장 기질 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 및 중피종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 신세포 암종 (RCC)을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 RCC에 걸린 대상체에게 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포외 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 VEGF 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 RCC에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 및 악시티닙, 파조파닙, 및 소라페닙으로부터 선택된 VEGF 길항제를 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 이전에 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 및 수니티닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제로 치료된 것인, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 이전에 파조파닙으로 치료되었다. 일부 실시양태에서, 대상체의 암은 파조파닙 치료 동안에 또는 파조파닙 치료 이후에 파조파닙-저항성이 되었다. 일부 실시양태에서, 파조파닙-저항성 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 파조파닙-저항성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 파조파닙 및 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 악시티닙을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 이전에 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 및 수니티닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제로 치료된 것인, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 이같은 실시양태에서, 하나 이상의 치료제가 파조파닙, 악시티닙, 및 소라페닙으로부터 선택된다. 일부 이같은 실시양태에서, 하나 이상의 치료제는 파조파닙이다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 교모세포종, 및 중피종으로부터 선택된다.

[0022] 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 VEGF-저항성 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 암은 FGF2 발현이 높고/높거나 FGF2/VEGF 비가 1을 초과하는 암이다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 교모세포종, 및 중피종으로부터 선택된다.

[0023] 일부 실시양태에서, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포

함한다. 일부 실시양태에서, 전체 종양 샘플에서 혈관 밀도가 측정된다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 교모세포종, 및 중피종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종이다.

[0024] 일부 실시양태에서, 중피종에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 및 파클리탁셀, 카르보플라틴, 도세탁셀, 페메트렉세드, 및 시스플라틴으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 투여하는 것을 포함하는, 중피종을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 파클리탁셀 및 카르보플라틴을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 도세탁셀을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 페메트렉세드, 및 시스플라틴을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 치료제의 투여는 중피종에서 혈관 밀도를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 중피종은 높은 FGF2 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중피종은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1을 초과한다.

[0025] 임의의 본원에 기술된 방법에서, 이러한 방법은 FGFR1 ECD를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 서열 1 내지 4로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 임의의 본원에 기술된 방법에서, 이러한 방법은 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 FGFR1 ECD 및 융합 파트너를 포함하며, 여기서 융합 파트너는 Fc이다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 서열 5 및 서열 6으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0027] 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 용도이며, 여기서 상기 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖고, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 용도이며, 여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되고, 암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.

[0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 의약의 제조에서의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 용도이며, 여기서 상기 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖고, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 의약의 제조에서의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 용도이며, 여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되고, 암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.

[0031] 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제의 용도이며, 여기서 상기 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖고, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.

[0032] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 용도이며, 여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분은 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되고, 암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제에 대한 암에 의한 치료 반응성

을 나타내는 것인 용도를 제공한다.

- [0033] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 의약의 제조에서의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 항혈관신생제의 용도이며, 여기서 상기 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖고, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 항혈관신생제에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.
- [0034] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서의 암 치료를 위한 의약의 제조에서의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 항혈관신생제의 용도이며, 여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 항혈관신생제의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부는 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되고, 암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 항혈관신생제에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타내는 것인 용도를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 한 실시양태에서, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법에서 사용하기 위한 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 단백질이 제공된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 고형 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는다.
- [0036] 본 발명의 한 실시양태에서, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조에서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 단백질의 용도가 제공된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 고형 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는다.
- [0037] 본 발명의 추가적인 실시양태에서, 중피종 치료에서 사용하기 위한 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 및 파클리탁셀, 카르보플라틴, 도세탁셀, 페메트렉세드 및 시스플라틴으로부터 선택된 하나 이상의 치료제가 제공된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 치료는 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 파클리탁셀 및 카르보플라틴의 사용을 수반한다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 치료는 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 도세탁셀의 사용을 수반한다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 치료는 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 페메트렉세드, 및 시스플라틴의 사용을 수반한다. 이러한 측면들 중 임의의 것에서, FGFR1 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 치료제의 투여는 상기 중피종에서 혈관 밀도를 감소시킨다.
- [0038] 본 발명의 추가적인 실시양태에서, 중피종 치료에서 사용하기 위한 의약의 제조에서의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 및 파클리탁셀, 카르보플라틴, 도세탁셀, 페메트렉세드 및 시스플라틴으로부터 선택된 하나 이상의 치료제의 용도가 제공된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 의약은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 파클리탁셀 및 카르보플라틴을 포함한다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 의약은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 도세탁셀을 포함한다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 상기 의약은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 페메트렉세드, 및 시스플라틴을 포함한다. 이러한 측면들 중 임의의 것에서, 상기 의약의 투여는 상기 중피종에서 혈관 밀도를 감소시킨다.
- [0039] 이러한 실시양태들의 임의의 측면에서, FGF2 수준 또는 VEGF 수준은 mRNA 수준일 수 있다. 이러한 측면의 한 특색에서, 정량적 RT-PCR에 의해 mRNA 수준이 결정될 수 있다.
- [0040] 추가로, 이러한 실시양태들의 임의의 측면에서, FGF2 수준 또는 VEGF 수준은 단백질 수준일 수 있다. 이러한 측면의 한 특색에서, 면역조직화학에 의해 단백질 수준이 결정될 수 있다.
- [0041] 이러한 실시양태들의 임의의 측면에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다. 이러한 측면의 추가적인 특색에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택된다.
- [0042] 이러한 실시양태들의 임의의 측면에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 및 전립선암으로부터 선택된다.
- [0043] 이러한 실시양태들의 임의의 측면에서, 암 치료에서 사용된 조성물 또는 암 치료에서 사용된 의약은 FGFR1 ECD를 포함한다. 이러한 측면의 한 특색에서, FGFR1 ECD는 서열 1 내지 4로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0044] 이러한 실시양태들의 임의의 측면에서, 암 치료에서 사용된 조성물 또는 암 치료에서 사용된 의약은 FGFR1 ECD 융합 분자를 포함한다. 이러한 측면의 한 특색에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 FGFR1 ECD 및 융합 파트너를 포함하며, 여기서 융합 파트너는 Fc이다. 이러한 측면의 한 추가적인 특색에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 서열 5 및

서열 6으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0045] 이러한 일부 실시양태의 임의의 측면에서, "세포의 적어도 일부분"은 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이다.

[0046] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자는 약 0.5 mg/체중 kg 내지 약 30 mg/체중 kg 범위의 양, 예컨대 약 8 내지 약 16 mg/체중 kg 범위의 양이다 (1.42 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산됨). 표 1을 참조한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 치료 유효량은 약 8 mg/체중 kg의 용량이다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 치료 유효량은 약 16 mg/체중 kg의 용량이다. 일부 실시양태에서, 투여량이 1주일에 2번, 매주, 격주로, 매주 내지 격주 사이의 빈도로, 3주마다, 4주마다 또는 매달 투여될 수 있다.

[0047] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암, 유방암, 결장직장암, 위암, 폐암, 뇌암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 후두암, 간암, 신암 (신장암), 교모세포종, 또는 췌장암이다. 특정 실시양태에서, 암은 유방암, 식도암, 신암, 두경부암, 또는 폐암이다. 특정 실시양태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 비-소세포 폐암이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 소세포 폐암이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 두경부암이다. 일부 실시양태에서, 두경부암은 두경부의 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 및 중피종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종이다.

[0048] 임의의 본원에 기술된 실시양태 또는 이의 임의의 조합이 본원에 기술된 본 발명의 임의의 모든 방법에 적용된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도면의 간단한 설명

도 1A-C는 실시예 2에 기술된 바와 같은, ACHN 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 2A-C는 실시예 3에 기술된 바와 같은, 786-0 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), 파조파넵, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 3A-C는 실시예 4에 기술된 바와 같은, A498 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), 파조파넵, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 4A-B는 실시예 5에 기술된 바와 같은, Caki-2 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), 파조파넵, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 5A-C는 실시예 6에 기술된 바와 같은, SK-Hep-1 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), 파조파넵, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 6A-C는 실시예 7에 기술된 바와 같은, (A) HepG2 세포, (B) Huh7 세포, 및 (C) Hep3B 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 또는 알부민 또는 비히클로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 7A-C는 실시예 8에 기술된 바와 같은, SK-Hep-1 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), 소라페넵, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 소라페넵, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 (A) 다양한 시점의 평균 종양 부피, 및 (B) 최종 종양 부피 및 (C) 최종 종양 중량을 나타낸다.

도 8A-B는 실시예 9에 기술된 바와 같은, FGFR1-ECD.339-Fc 반응자 및 비-반응자 이중이식편에서의 (A) FGF2

mRNA (GUSB에 대해 정규화됨) 및 (B) FGF2 단백질 발현 (총 단백질에 대해 정규화됨)을 나타낸다.

도 9A-B는 실시예 9에 기술된 바와 같은, FGFR1-ECD.339-Fc 반응자 및 비-반응자 이중이식편에서의 (A) VEGFA mRNA (GUSB에 대해 정규화됨) 및 (B) VEGFA 단백질 발현 (총 단백질에 대해 정규화됨)을 나타낸다.

도 10는 실시예 11에 기술된 바와 같은, NCI-H226 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 11는 실시예 11에 기술된 바와 같은, MSTO-211H 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc로 처리된 마우스에서의 다양한 시점의 평균 종양 부피를 나타낸다.

도 12A-C는 실시예 11에 기술된 바와 같은, NCI-H226 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc로 처리된 마우스에서의 면역조직화학에 의해 결정된 혈관 면적을 나타낸다.

도 13A-B는 실시예 12에 기술된 바와 같은, HLF 세포가 이식되고 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039"), 소라페닙, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 소라페닙, 또는 알부민으로 처리된 마우스에서의 (A) 다양한 시점의 평균 종양 부피 및 (B) 최종 종양 부피를 나타낸다.

도 14A-B는 실시예 4에 기술된 바와 같은, (A) 제89일의 파조파넵-처리 A498 이중이식편 모델 마우스에서의 종양 크기에 비교된, A498 세포가 이식되고 파조파넵 단독 또는 파조파넵 및 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") (제89일에 시작됨)로 처리된 마우스의 종양 크기 백분율; 및 (B) 제110일의 종양 크기 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본원에서 사용된 섹션 제목은 구조적인 목적만을 위한 것이고, 기술된 주제를 한정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

정의

달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련되어 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 관련 분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 의미를 지닐 것이다. 추가로, 문맥적으로 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수를 포함하고, 복수형 용어는 단수를 포함한다.

제조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 조직 배양 및 형질전환 (예를 들어, 전기천공, 리포펙션(lipofection)), 효소 반응, 및 정제 기술과 관련하여 사용된 특정 기술이 관련 분야에 공지되어 있다. 다수의 이같은 기술 및 절차가, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))]에 특히 기술되어 있다. 또한, 화학적 합성, 화학적 분석, 제약학적 제조, 제형, 및 전달, 및 환자 치료를 위한 특정 기술이 또한 관련 분야에 공지되어 있다.

본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 다중 종속항의 상황에서, "또는"의 사용은 1개를 초과하는 선행 독립항 또는 종속항을 택일적으로만 다시 언급한다. 또한, 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어는 1개의 단위를 포함하는 요소 및 성분, 및 1개를 초과하는 하위단위를 포함하는 요소 및 성분을 둘 다 포함한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 모든 숫자는 근사값이고, 측정 오차 및 유효 숫자의 반올림을 설명하기 위해 변할 수 있다. 특정 측정량 앞에서의 "약"의 사용은 샘플 불순물, 측정 오차, 인간의 오차, 및 통계적 변동, 뿐만 아니라 유효 숫자의 반올림으로 인한 변동을 포함한다.

본 개시내용에 따라 사용된 바와 같이, 달리 지시되지 않는 한 하기의 용어들은 하기의 의미를 지니는 것으로 이해되어야 한다:

"핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는 상호교환가능하게 사용될 수 있고, 뉴클레오타이드들의 중합체를 지칭한다. 뉴클레오타이드들의 이같은 중합체는 천연 및/또는 비-천연 뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, DNA, RNA, 및 PNA를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. "핵산 서열"은 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드를 이루는 뉴클레오타이드들의 선형 서열을 지칭한다.

"폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 아미노산 잔기들의 중합체를 지칭하도록 상호교환가능하게 사용되고, 최소 길이에 한정되지 않는다. 아미노산 잔기들의 이같은 중합체는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 함유할

수 있고, 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이량체, 삼량체 및 다량체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편 양쪽 모두가 이러한 정의에 포함된다. 이러한 용어는 폴리펩티드의 번역-후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 또한 포함한다. 추가로, 본 발명의 목적을 위해, "폴리펩티드"는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 변형, 예컨대 결실, 부가 및 치환 (일반적으로 성질 면에서 보존적임)을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위-지정 돌연변이유발을 통해서와 같이 의도적일 수 있거나, 또는 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해서와 같이 우발적일 수 있다. 폴리펩티드가 특정 아미노산 서열로 "이루어지는" 경우, 이는 번역-후 변형, 예컨대 글리코실화 및 시알릴화를 여전히 함유할 수 있다.

[0060]

"FGFR1 세포외 도메인" ("FGFR1 ECD")이라는 용어는 전장 FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 단편, 및 FGFR1 ECD 변이체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, **"FGFR1 ECD"**라는 용어는 신호 펩티드가 있는 또는 신호 펩티드가 없는, 세포내 및 막횡단 도메인이 결여된 FGFR1 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 서열 1 및 2로부터 선택된 아미노산 서열의 인간 전장 FGFR1 ECD이다. 본원에서 사용된 바와 같은 **"전장 FGFR1 ECD"**라는 용어는 세포외 도메인의 마지막 아미노산까지 걸쳐진 FGFR1 ECD를 지칭하고, N-말단 신호 펩티드를 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 본원에서 정의된 바와 같이, 전장 FGFR1 ECD의 마지막 아미노산은 위치 353에 있다. 따라서, 인간 전장 FGFR1 ECD는 서열 2 (성숙형) 또는 서열 1 (신호 펩티드 있음)에 상응하는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, **"FGFR1 ECD 단편"**이라는 용어는 전장 ECD의 N 및/또는 C 말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실되었고 FGF-2에 결합하는 능력을 유지하는 FGFR1 ECD를 지칭한다. FGFR1 ECD 단편은 N-말단 신호 펩티드를 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 단편은 서열 4 (성숙형) 또는 서열 3 (신호 펩티드 있음)에 상응하는 아미노산 서열의 인간 FGFR1 ECD 단편이다.

[0061]

본원에서 사용된 바와 같이, **"FGFR1 ECD 변이체"**라는 용어는 아미노산 부가, 결실 및 치환을 함유하고 여전히 FGF-2에 결합할 수 있는 FGFR1 ECD를 지칭한다. 이같은 변이체는 모 FGFR1 ECD에 대해 적어도 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 2개의 폴리펩티드의 % 동일성은 유사성을 결정하기 위한 디폴트 (default) 설정으로 베스트핏(Bestfit) 프로그램을 사용하여 2개의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 비교함으로써 결정된 유사성 점수에 의해 측정될 수 있다. 베스트핏은 문헌 [Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘을 사용하여 2개의 서열 간의 최상의 유사성 분절을 확인한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 변이체는 서열 4의 서열에 대해 95% 이상 동일하다.

[0062]

FGFR1 ECD 폴리펩티드의 기준 아미노산 서열에 대해 적어도 예를 들어 95% 동일한 아미노산 서열의 폴리펩티드는 폴리펩티드 서열이 기준 폴리펩티드의 아미노산 100개 당 5개까지의 아미노산 변경을 포함할 수 있는 것을 제외하고는 폴리펩티드의 아미노산 서열이 기준 서열과 동일한 것이다. 달리 말하면, 기준 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열의 폴리펩티드를 수득하기 위해, 기준 서열 내의 아미노산 잔기의 5%까지가 결실되거나 또는 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있거나, 또는 기준 서열 내의 총 아미노산 잔기의 5%까지의 다수의 아미노산이 기준 서열 내로 삽입될 수 있다. 기준 서열의 이러한 변경은 기준 아미노산 서열의 N- 또는 C-말단 위치에서, 또는 이러한 말단 위치들 사이의 임의의 위치 (기준 서열의 잔기들 사이에 개별적으로 또는 기준 서열 내의 하나 이상의 연속적인 군으로 산재됨)에서 발생할 수 있다.

[0063]

실제로, 임의의 특정 폴리펩티드가, 예를 들어, 서열 목록에 기재된 아미노산 서열 또는 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열에 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95% 동일한지 여부를 통상적으로 공지된 컴퓨터 프로그램, 예컨대 베스트핏 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 베스트핏 또는 기타 서열 정렬 프로그램을 사용하여 특정 서열이 본 발명에 따른 기준 서열에 대해 예를 들어 95% 동일한지 여부를 결정할 때, 당연히, 기준 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 동일성 백분율이 계산되도록, 그리고 기준 서열 내의 아미노산 잔기의 총 개수의 5%까지의 상동성에서의 갭(gap)이 허용되도록 파라미터가 설정된다.

[0064]

본원에서 사용된 바와 같이, **"hFGFR1-ECD.353"** 및 **"hFGFR1.353"**이라는 용어는 서열 1 (신호 펩티드 있음) 또는 서열 2 (신호 펩티드 없음; 성숙형)에 상응하는 전장 인간 FGFR1 ECD를 지칭하도록 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0065]

본원에서 사용된 바와 같이, **"hFGFR1-ECD.339"** 및 **"hFGFR1.339"**라는 용어는 서열 3 (신호 펩티드 있음) 또는 서열 4 (신호 펩티드 없음; 성숙형)에 상응하는 인간 FGFR1 ECD를 지칭하도록 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0066]

추가적인 hFGFR1 ECD가, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890 (모든 목적을 위해 본원에 전문이 참고로 포함됨)에 기술되어 있다.

- [0067] "FGFR1 ECD 융합 분자"라는 용어는 FGFR1 ECD, 및 하나 이상의 "융합 파트너"를 포함하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및 융합 파트너는 공유결합으로 연결된다 ("융합"된다). 융합 파트너 또한 폴리펩티드 ("융합 파트너 폴리펩티드")이면, FGFR1 ECD 및 융합 파트너 폴리펩티드가 연속적인 아미노산 서열의 일부일 수 있고, 융합 파트너 폴리펩티드가 FGFR1 ECD의 N 말단 또는 C 말단에 연결될 수 있다. 이같은 경우에, FGFR1 ECD 및 융합 파트너 폴리펩티드가 FGFR1 ECD 및 융합 파트너 폴리펩티드 양쪽 모두를 코딩하는 코딩 서열로부터 단일 폴리펩티드로서 번역될 수 있다 ("FGFR1 ECD 융합 단백질"). 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및 융합 파트너가 다른 수단, 예를 들어, 펩티드 결합 이외의 화학 결합을 통해 공유결합으로 연결된다. 폴리펩티드를 다른 분자 (예를 들어, 융합 파트너)에 공유결합으로 연결시키는 다수의 공지된 방법을 사용할 수 있다. 다른 실시양태에서, FGFR1 ECD 및 융합 파트너는 하나 이상의 아미노산 또는 화학적 모이어티(moiety)로 구성된 "링커"를 통해 융합될 수 있다.
- [0068] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 폴리펩티드 및 융합 파트너는 비-공유결합으로 연결된다. 일부 이같은 실시양태에서, 예를 들어, 결합 쌍을 사용하여 이들이 연결될 수 있다. 예시적인 결합 쌍은 비오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘, 항체 및 이의 항원 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0069] 예시적인 융합 파트너는 면역글로불린 Fc 도메인, 알부민, 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 예시적인 Fc 도메인의 아미노산 서열이 서열 8 내지 10에서 제시된다. 일부 실시양태에서, Fc에 융합된 FGFR1 ECD가 "hFGFR1 ECD-Fc"로 지칭된다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc, IgG2 Fc, IgG3 Fc, 및 IgG4 Fc로부터 선택된다.
- [0070] 본원에서 사용된 바와 같이, "hFGFR1-ECD.339-Fc", "hFGFR1.339-Fc", 및 "FP-1039"라는 용어는 서열 6 (신호 펩티드 없음, 성숙형) 및 서열 5 (신호 펩티드 있음)로부터 선택된 아미노산 서열을 지칭하도록 상호교환가능하게 사용될 수 있다. hFGFR1-ECD.339-Fc로 치료될 수 있는 비제한적인 예시적인 암은 폐암, 결장암, 유방암, 위암, 두경부암, 전립선암, 자궁내막암, 육종, 소세포 폐암, 난소암, 카포시 육종, 호지킨병, 백혈병, 비-호지킨 림프종, 신경모세포종 (뇌암), 횡문근육종, 윌름 종양, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 방광암, 고환암, 림프종, 생식 세포 종양, 결장직장암, 위장암, 위장 기질 종양, 갑상선암, 다발 골수종, 췌장암, 중피종, 악성 늑막 중피종, 혈액/림프 암, 악성 복막 중피종, 식도암, 신세포 암종, 다형성 교모세포종, 및 간암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0071] "신호 펩티드"라는 용어는 포유동물 세포로부터의 폴리펩티드의 분비를 용이하게 하는 폴리펩티드의 N 말단에 위치하는 아미노산 잔기들의 서열을 지칭한다. 포유동물 세포로부터 폴리펩티드가 외수송될 때 신호 펩티드가 절단되어, 성숙 단백질이 형성될 수 있다. 신호 펩티드는 천연 또는 합성일 수 있고, 자신이 부착되는 단백질에 대해 이종성 또는 동종성일 수 있다. 예시적인 신호 펩티드는 FGFR1 신호 펩티드, 예를 들어, 서열 7의 아미노산 서열을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 신호 펩티드는 이종성 단백질로부터의 신호 펩티드를 또한 포함한다. "신호 서열"은 신호 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD에서 신호 펩티드가 결여된다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 하나 이상의 신호 펩티드를 포함하고, 이는 천연 FGFR1 신호 펩티드 또는 이종성 신호 펩티드일 수 있다.
- [0072] "벡터"라는 용어는 숙주 세포 내에서 증식할 수 있는 클로닝된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들을 함유하도록 조작될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 기술하도록 사용된다. 벡터는 하기 요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 복제 기원, 관심 폴리펩티드의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서), 및/또는 하나 이상의 선별성 마커 유전자 (예를 들어, 항생제 저항성 유전자 및 비색 검정법에서 사용될 수 있는 유전자, 예를 들어, β -갈락토시다제(galactosidase)). "발현 벡터"라는 용어는 숙주 세포에서 관심 폴리펩티드를 발현시키는데 사용하는 벡터를 지칭한다.
- [0073] "숙주 세포"는 벡터 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 수용자일 수 있거나 또는 이의 수용자였던 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 예시적인 진핵생물 세포는 포유동물 세포, 예컨대 영장류 또는 비-영장류 동물 세포; 진균 세포; 식물 세포; 및 곤충 세포를 포함한다. 예시적인 포유동물 세포는 293 및 CHO 세포, 및 이들의 유도체, 예컨대 각각 293-6E 및 DG44 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0074] 본원에서 사용된 바와 같은 "단리된"이라는 용어는 자연에서 전형적으로 자신과 함께 발견되는 성분들 중 적어도 일부로부터 분리된 분자를 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 자신이 생산된 세포의 성분 중 적어도 일부로부터 분리된 경우 "단리된" 것으로 지칭된다. 폴리펩티드가 발현 후에 세포에 의해 분비되는 경우, 폴리펩티드를 함유하는 상청액을 이를 생산한 세포로부터 물리적으로 분리하는 것은 폴리펩티드를 "단리"하는 것으로 간

주된다. 유사하게, 자신이 자연에서 전형적으로 발견되는 더 큰 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 폴리뉴클레오티드의 경우 게놈 DNA 또는 미토콘드리아 DNA)의 일부가 아닐 때, 또는 자신이 생산된 세포의 성분 중 적어도 일부로부터 분리되었을 때 (예를 들어, RNA 폴리뉴클레오티드의 경우), 폴리뉴클레오티드가 "단리된" 것으로 지칭된다. 따라서, 숙주 세포 내부의 벡터 내에 함유된 DNA 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드가 자연에서 이러한 벡터 내에서 확인되지 않는 한 "단리된" 것으로 지칭될 수 있다.

[0075]

"**항신생물 조성물**"이라는 용어는 하나 이상의 활성 치료제, 예를 들어, "**항암제**"를 포함하는, 암을 치료하는데 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제 (항암제)의 예는, 예를 들어, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 세포자멸사 작용제, 항-튜블린 작용제, 암을 치료하기 위한 기타 작용제, 예컨대 항-VEGF 항체 (예를 들어, 베마시주맙, 아바스틴(AVASTIN®), 항-HER-2 항체 (예를 들어, 트라스투주맙, 허셉틴(HERCEPTIN®), 항-CD20 항체 (예를 들어, 리툽시맙, 리툽산(RITUXAN®), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 타이로신 키나제(kinase) 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙, 타르세바(TARCEVA®), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡(GLEEVEC®), 이매티닙 메실레이트), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레코싯), 인터페론, 사이토카인, ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 표적 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 기타 생활성 및 유기 화학 작용제 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이들의 조합 또한 본 발명에 포함된다.

[0076]

"**화학요법제**"는 암 치료에서 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예는 알킬화제 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN®); 알킬 술포네이트 예컨대 부술폰, 임프로술폰 및 피포술폰; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스파라미드, 트리에틸렌티오포스파라미드 및 트리메틸로멜라민이 포함되는, 에틸렌이민 및 메틸렌라멜라민; 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로카나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL®); 베타-라파곤; 라파콜; 콜히친; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포사이드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕타이딘; 스폰기스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 엔다이인 항생제 (예를 들어, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 감마II 및 칼리키아마이신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Nicolau et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 경구 알파-4 인테그린 억제제인 CDP323; 다인마이신 A가 포함되는 다인마이신; 에스페라마이신; 뿐만 아니라 네오키지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 엔다이인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN®), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (독실(DOXIL®), 리포솜형 독소루비신 TLC D-99 (마이오세트(MYOCET®), PEG화 리포솜형 독소루비신 (카엘릭스(CAELYX®), 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페폴로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사산물 예컨대 메토트렉세이트, 젬시타빈 (젬자르(GEMZAR®), 페메트렉세드 (알림타(ALIMTA®); 테가푸르 (우프트랄(UFTORAL®), 카페시타빈 (젤로다(XELODA®), 에포틸론, 및 5-플루로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프레노프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피리딘, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자유리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스유리딘; 안드로젠 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신제 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타; 엽산 보충제 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 메이탄시노이드 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜

토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로숙산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오리건주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포프로단; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®), 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제형 (아브락산(ABRAXANE)™), 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®); 클로람부실; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메트트렉세이트; 백금 작용제 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)®), 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®), 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신 (FILDESIN)®), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®)을 포함하는, 튜블린 중합으로 미세관이 형성되는 것을 방지하는 빈카; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 백사로텐 (타르그레틴(TARGRETIN)®)을 포함하는, 레티노이드 예컨대 레티노산; 비스포스포네이트 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스타크(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사막스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 티루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 사이토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 연루된 신호전달 경로 내의 유전자, 예를 들어, PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)의 발현을 억제하는 것; 백신 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)®); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®); BAY439006 (소라페닙, 넥사바르(NEXAVAR)®; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트(SUTENT)®, 화이자); COX-2 억제제인 페리포신 (예를 들어 셀레코싹 또는 에토리콕싹), 프로테오솜 억제제 (예를 들어 PS341); 보르테조미 (벨케이드(VELCADE)®); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제 예컨대 오블리메르센 소듐 (제나센스(GENASENSE)®); 픽산트론; EGFR 억제제 (하기의 정의 참조); 타이로신 키나제 억제제 (하기의 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파뮌(RAPAMUNE)®); 파르네실트랜스퍼라제 억제제 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)™); 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2가지 이상의 조합물 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP; 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴®)을 사용한 치료법에 대한 약자인 FOLFOX를 포함한다.

[0077]

본원에서 정의된 바와 같은 화학요법제는 암 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절하거나, 감소시키거나, 차단하거나 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이는 호르몬 자체일 수 있고, 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 타목시펜 (놀바텍스®), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)®), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조정제 (SERM) 예컨대 SERM3을 포함하는, 혼합형 작동제/길항제 프로파일 이 있는 항-에스트로겐; 작동제 성질이 없는 순수한 항-에스트로겐, 예컨대 풀베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)®), 및 EM800 (이같은 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단할 수 있고/있거나, DNA 결합을 억제할 수 있고/있거나, ER 턴오버(turnover)를 증가시킬 수 있고/있거나, ER 수준을 억제할 수 있다); 스테로이드성 아로마타제 억제제 예컨대 포르메스탄 및 엑스메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 및 비-스테로이드성 아로마타제 억제제 예컨대 아나스트로졸 (아리믹스(ARIMIDEX)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®) 및 아미노글루테티미드, 및 기타 아로마타제 억제제 (보로졸 (리비소르(RIVISOR)®), 메게스트롤 아세테이트 (메게이스(MEGASE)®), 파드로졸, 및 4(5)-이미다졸을 포함함)를 포함하는, 아로마타제 억제제; 류프롤리드 (루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)®), 고세렐린, 부세렐린, 및 트리프테렐린을 포함하는 황체형성 호르몬-방출 호르몬 작동제; 프로게스틴 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐 예컨대 디에틸stil베스트롤 및 프레마린, 및 안드로젠/레티노이드 예컨대 플루옥시메스테론, 올(all) 트랜스레티노산 및 퀘레티니드를 포함하는 성 호르몬; 오나프리스톤; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항-항드로젠 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2가지 이상의 조합물.

[0078]

"혈관형성 인자 또는 작용제"는 혈관 발달을 자극하는, 예를 들어, 혈관형성, 내피 세포 성장, 혈관 안정성, 및/또는 맥관형성 등을 촉진하는 성장 인자를 지칭한다. 예를 들어, 혈관형성 인자는 VEGF 및 VEGF 패밀리의 구

성원 (VEGF-B, VEGF-C 및 VEGF-D), PlGF, PDGF 패밀리, 섬유모세포 성장 인자 패밀리 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴(Angiopoietin)), 에프린, 델타-유사 리간드 4 (DLL4), del-1, 섬유모세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자 (HGF)/산란 인자 (SF), 인터루킨-8 (IL-8), 랩틴, 미드카인, 뉴로필린, 태반 성장 인자, 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판-유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파) 등을 예를 들어 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이는 상처 치유를 가속화하는 인자, 예컨대 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VEGF, 표피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 이의 패밀리의 구성원, 및 TGF-알파 및 TGF-베타를 또한 포함할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179]; [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지된 혈관형성 인자가 열거된 표 1); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206]을 참조한다.

[0079]

"항혈관신생제" 또는 **"혈관형성 억제제"**는 혈관형성, 맥관형성 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접적으로 또는 간접적으로 억제하는 저분자량 물질, 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, 억제성 RNA (RNAi 또는 siRNA) 포함), 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이들의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 항혈관신생제가 혈관형성 인자 또는 이의 수용체에 결합하고 이들의 혈관형성 활성을 차단하는 작용제를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관형성 작용제에 대한 항체 또는 기타 길항제, 예를 들어, VEGF에 결합하는 융합 단백질 예컨대 잘트랩(ZALTRAP)TM (아플리베르셉트(Aflibercept)), VEGF에 대한 항체 예컨대 아바스틴(AVASTIN)[®] (베바시주맵) 또는 VEGF 수용체 (예를 들어, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체, 항-PDGFR 억제제 예컨대 글리벡[®] (이매티닙 메실레이트), VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소형 분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, 수텐트[®]/SU11248 (수니티닙 말레이트), AMG706, 또는 국제 특허 출원 WO 2004/113304에 예를 들어 기술된 것들)이다. 항혈관신생제는 천연 혈관형성 억제제, 예를 들어, 안지오테스틴, 엔도스테틴 등을 또한 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179] (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항혈관형성 요법이 열거된 표 3); [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지된 항혈관형성 인자가 열거된 표 2); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206] (예를 들어, 임상 시험에서 사용된 항혈관신생제가 열거된 표 1)을 참조한다.

[0080]

본원에서 사용된 바와 같은 **"VEGF"** 또는 **"VEGFA"**라는 용어는 문헌 [Leung et al. (1989) Science 246:1306], 및 [Houck et al. (1991) Mol. Endocrin. 5:1806]에 기술된 바와 같은 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련된 121-, 189-, 및 206-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자를 이의 천연 발생 대립유전자 및 프로세싱 형태와 함께 지칭한다. "VEGF"라는 용어는 비-인간 종 예컨대 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 또한 지칭한다. 때때로, 인간 VEGF에 대한 hVEGF, 뮤린(murine) VEGF에 대한 mVEGF 등과 같은 용어에 의해 특정 종으로부터의 VEGF가 지시된다. "VEGF"라는 용어는 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단 형태를 지칭하도록 또한 사용된다. 예를 들어, "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)," "VEGFA₁₀₉" 또는 "VEGF165"에 의해, VEGF의 임의의 이같은 형태에 대한 언급이 본 출원에서 확인될 수 있다. "말단절단" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에서 지시된 바와 같이 번호가 매겨진다. 예를 들어, 말단절단 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단 천연 VEGF는 천연 VEGF에 필적하는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대한 결합 친화력을 지닌다.

[0081]

"VEGF 길항제"는 VEGF가 하나 이상의 VEGF 수용체에 결합하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 VEGF 활성을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지시키거나, 감소시키거나 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. VEGF 길항제는, 비제한적으로, 항-VEGF 항체 및 이의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합함으로써 하나 이상의 수용체에 대한 이의 결합을 봉쇄하는 수용체 분자 및 유도체, 항-VEGF 수용체 항체, VEGF 수용체 길항제 예컨대 VEGFR 타이로신 키나제의 소형 분자 억제제 (예를 들어, 파조파닙), 및 VEGF에 결합하는 이뮤노어드헤신(immunoadhesin) 예컨대 VEGF 트랩(trap) (예를 들어, 아플리베르셉트)을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 **"VEGF 길항제"**라는 용어는 VEGF에 결합하고 VEGF 활성을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지시키거나, 감소시키거나 또는 방해할 수 있는 분자 (항체, 항체 단편, 기타 결합 폴리펩티드, 펩티드, 및 비-펩티드 소형 분자 포함)를 명확하게 포함한다. 따라서, "VEGF 활성"이라는 용어는 VEGF의 VEGF-매개 생물학

적 활성을 명확하게 포함한다.

[0082] 본원에서 사용된 바와 같은 **"VEGF 트랩"**이라는 용어는 VEGF에 결합하고 VEGF 활성을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지시키거나, 감소시키거나 또는 방해할 수 있는 단백질, 예컨대 융합 분자를 의미한다. VEGF 트랩의 예는 아플리베르셉트이다.

[0083] **"항-VEGF 항체"** 또는 **"VEGF에 결합하는 항체"**라는 용어는 항체가 VEGF 표적화에서 진단 및/또는 치료 작용제로서 유용하도록 충분한 친화력 및 특이성으로 VEGF에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 항-VEGF 중화 항체는 누드 마우스에서 다양한 인간 종양 세포주의 성장을 억제하고 (Kim et al., Nature 362:841-844 (1993); Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgstroem et al., Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); Melnyk et al., Cancer Res. 56:921-924 (1996)), 또한 허혈성 망막 장애 모델에서 안구내 혈관형성을 억제한다. 문헌 [Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)]. 예를 들어, 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 수반되는 질환 또는 상태를 표적화하고 방해하는 것에서 치료제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,582,959, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202, WO2005/044853; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208, 및 20050112126; 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]; 및 WO2005012359를 참조한다. 선택된 항체는 일반적으로 VEGF에 대한 결합 친화력이 충분히 강할 것이다. 예를 들어, 항체는 100 nM-1 pM의 K_d 값으로 hVEGF에 결합할 수 있다. 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 기반 검정법 (예컨대 PCT 출원 공개 번호 WO2005/012359에 기술된 바와 같은 BIAcore 검정법); 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA); 및 경쟁 검정법 (예를 들어 RIA)에 의해 항체 친화력이 결정될 수 있다. 예를 들어, 치료제로서의 항체의 유효성을 평가하기 위해, 항체가 기타 생물학적 활성 검정법에 적용될 수 있다. 이같은 검정법은 관련 분야에 공지되어 있고, 표적 항원 및 항체에 대한 의도되는 용도에 좌우된다. 예는 HUVEC 억제 검정법; 종양 세포 성장 억제 검정법 (예를 들어, WO 89/06692에 기술된 바와 같음); 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-매개 세포독성 (CDC) 검정법 (미국 특허 5,500,362); 및 작동제 활성 또는 조혈 검정법 (WO 95/27062 참조)을 포함한다. 항-VEGF 항체는 일반적으로 기타 VEGF 상동체 예컨대 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 또는 VEGF-E, 또는 기타 성장 인자 예컨대 PlGF, PDGF 또는 bFGF에 결합하지 않을 것이다.

[0084] 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체; **"베바시주맙"**으로 공지되어 있고 "rhMab VEGF" 또는 "아바스틴(AVASTIN)®"으로 또한 공지된 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체 (문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599] 참조)를 포함한다. 아바스틴®은 현재 시판된다. 베바시주맙으로 치료될 수 있는 비제한적인 예시적인 암은 비-소세포 폐암, 결장직장암, 유방암, 신암, 난소암, 다형성 교모세포종, 소아 골육종, 위암 및 췌장암을 포함한다. 베바시주맙은 돌연변이된 인간 IgG₁ 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF가 이의 수용체에 결합하는 것을 차단하는 무인 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성-결정 영역을 포함한다. 베바시주맙 및 기타 인간화 항-VEGF 항체가 미국 특허 번호 6,884,879, 및 7,169,901에 추가로 기술되어 있다. 추가적인 항-VEGF 항체가 PCT 출원 공개 번호 WO2005/012359 및 WO2009/073160; 미국 특허 번호 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020; 6,054,297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 공개 번호 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, 및 20050112126; 및 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]에 기술되어 있다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같이, **"VEGF-저항성 종양"** 및 **"VEGF-저항성 암"**은 기준 샘플, 세포 또는 조직보다 더 높은 FGF2 수준을 갖는 종양 또는 암을 지칭한다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 종양은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 종양 샘플에서의 FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비는 1을 초과한다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 종양이 있는 대상체는 이전에 파조파넬, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 및 수니티닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제로 치료되었다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같이, **"파조파넬-저항성 종양"** 및 **"파조파넬-저항성 암"**은 초기에는 파조파넬에 반응하였지만 더 이상 반응하지 않거나 더 적은 정도로 반응하는 종양 또는 암을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 파조파넬-저항성 종양 또는 암은 파조파넬의 존재 하에 더 이상 퇴행되지 않거나 또는 심지어 진행된다.

[0087] **"대상체"** 및 **"환자"**라는 용어는 포유동물을 지칭하도록 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 인간이다. 다른 실시양태에서, 설치류, 유인원, 고양이, 개, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 실험용 포유동물, 포유동물 가축, 스포츠용 포유동물, 및 애완용 포유동물을 포함하지만 이에 한정되지 않는 기

타 포유동물을 치료하는 방법이 또한 제공된다.

[0088]

본원에서 사용된 바와 같은 **"샘플"** 또는 **"환자 샘플"**이라는 용어는 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특징을 기초로 특성화 및/또는 확인될 세포성 및/또는 기타 분자성 엔티티(entity)를 함유하는 관심 대상체로부터 획득 또는 유래된 조성물을 지칭한다. 예를 들어, **"질환 샘플"**이라는 구절 및 이의 변형은 특성화될 세포성 및/또는 분자성 엔티티를 함유할 것으로 예상되거나 또는 이를 함유하는 것으로 공지된 관심 대상체로부터 획득된 임의의 샘플을 지칭한다. **"조직 또는 세포 샘플"**은 대상체 또는 환자의 조직으로부터 획득된 유사한 세포들의 선집을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선하고/하거나 동결되었고/되었거나 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터와 같은 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성물; 체액 예컨대 뇌척수액, 양수, 복수 또는 장액; 대상체의 임신 또는 발달 중 임의의 시기로부터의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 1차 세포 또는 세포주 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수도 있다. 임의적으로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/장기로부터 획득된다. 조직 샘플은 자연에서는 조직과 자연스럽게 혼합되지 않는 화합물 예컨대 방부제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 함유할 수 있다.

[0089]

본원에서 사용된 바와 같은 **"기준 샘플"**, **"기준 세포"**, 또는 **"기준 조직"**은 본 발명의 방법 또는 조성물이 이를 확인하기 위해 사용되고 있는 질환 또는 상태에 걸리지 않은 것으로 공지되었거나 또는 여겨지는 공급원으로부터 획득된 샘플, 세포 또는 조직을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 기준 샘플, 기준 세포 또는 기준 조직은 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 질환 또는 상태가 확인되고 있는 동일한 대상체 또는 환자의 신체의 건강한 부분으로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 기준 샘플, 기준 세포 또는 기준 조직은 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 질환 또는 상태가 확인되고 있는 대상체 또는 환자가 아닌 하나 이상의 개체의 신체의 건강한 부분으로부터 획득된다.

[0090]

본원에서 사용된 바와 같은 **"암"** 및 **"종양"**은 동물에서의 임의의 비정상적인 세포 또는 조직 성장 또는 증식을 지칭하는 상호교환가능한 용어이다. 본원에서 사용된 바와 같이, **"암"** 및 **"종양"**이라는 용어는 고형 및 혈액/림프 암을 포함하고, 악성, 전암성, 및 양성 성장, 예컨대 형성이상을 또한 포함한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이같은 암의 더욱 특정한 비제한적인 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 뇌하수체암, 식도암, 별아교세포종, 연조직 육종, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막암, 간세포암, 위장암, 위장 기질 종양, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 위암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관암종, 담낭 암종, 위암, 흑색종, 중피종, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0091]

"VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 세포"는 세포 내의 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준보다 더 높은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 세포를 지칭한다. **"VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암"**은 세포의 적어도 일부분이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준보다 더 높은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 암을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "세포의 적어도 일부분"은 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 세포, 또는 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암은 FGF2 대 VEGF의 비가 1을 초과한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 세포, 또는 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암은 FGF2가 VEGF보다 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 또는 25% 더 많다. 일부 실시양태에서, FGF2 및 VEGF의 수준은 mRNA 수준이다. 일부 이같은 실시양태에서, 정량적 RT-PCR, 마이크로어레이, 디지털 PCT, RNA-Seq, RNase 보호 검정법 (RPA), 노던 블롯, 및 원위치 혼성화 (ISH)로부터 선택된 방법에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 정량적 RT-PCR에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 마이크로어레이에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, FGF2 및 VEGF의 수준은 단백질 수준이다. 일부 이같은 실시양태에서, 면역조직화학, ELISA, 질량 분광법, 역상 단백질 어레이 (RPPA), 항체 어레이, 나노-면역검정법, 웨스턴 블롯, 및 모세관 단백질 분석 검정법으로부터 선택된 방법에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 면역조직화학에 의해 이러한 수준이 결정된다.

[0092]

"VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 세포"는 세포 내의 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준보다 더 낮은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 세포를 지칭한다. **"VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암"**은 세포의 적어도 일부분이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준보다 더 낮은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 암을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 낮은

FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 세포, 또는 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암은 FGF2 대 VEGF의 비가 1 미만이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 세포, 또는 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암은 VEGF보다 FGF2가 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 또는 25% 더 적다. 일부 실시양태에서, FGF2 및 VEGF의 수준은 mRNA 수준이다. 일부 이같은 실시양태에서, 정량적 RT-PCR, 마이크로어레이, 디지털 PCT, RNA-Seq, RNase 보호 검정법 (RPA), 노던 블롯, 및 원위치 혼성화 (ISH)로부터 선택된 방법에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 정량적 RT-PCR에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 마이크로어레이에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, FGF2 및 VEGF의 수준은 단백질 수준이다. 일부 이같은 실시양태에서, 면역조직화학, ELISA, 질량 분광법, 역상 단백질 어레이 (RPPA), 항체 어레이, 나노-면역 검정법, 웨스턴 블롯, 및 모세관 단백질 분석 검정법으로부터 선택된 방법에 의해 이러한 수준이 결정된다. 일부 실시양태에서, 면역조직화학에 의해 이러한 수준이 결정된다.

[0093] 본원에서 사용된 바와 같은 **"치료"**는 인간을 포함하는 포유동물에서의 상태에 대한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 포함하고, 상태 또는 상태의 진행을 억제하는 것, 상태 또는 이의 진행을 억제하거나 느리게 하는 것, 이의 발달을 정지시키는 것, 상태를 부분적으로 또는 완전히 경감시키는 것, 또는 상태를 치유하는 것 (예를 들어, 퇴행을 야기하거나, 또는 상실되거나 빠지거나 결함이 있는 기능을 회복시키거나 수리함으로써); 또는 불충분한 프로세스를 자극하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, "치료"는 치료되는 개체 또는 세포의 자연스러운 과정을 변경시키려는 시도의 임상적 개입을 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리의 과정 동안에 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발을 방지하는 것, 증상 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 축소, 전이를 방지하는 것, 질환 진행 속도를 감소시키는 것, 질환 상태의 호전 또는 고식, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함한다.

[0094] 분자 또는 분자들의 조합물의 **"유효량"** 또는 **"치료 유효량"**은 단독으로 또는 다른 치료와 조합되어 제공되었을 때 적어도 대상체의 부분집합에서 상태를 치료하는데 및/또는 종양 세포의 성장을 억제하는데 충분한 양을 의미한다. 특정 실시양태에서, 치료 유효량은 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 기간으로 이를 달성하는데 효과적인 양을 지칭한다. 본 발명의 FGFR1 융합 단백질의 치료 유효량은 질환 상태, 개체의 연령, 성 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 도출하는 FGFR1 융합 단백질의 능력과 같은 요인에 따라 다를 수 있다. 또한 치료 유효량은 치료적으로 이로운 효과가 FGFR1 융합 단백질의 임의의 독성이거나 해로운 효과보다 더 많은 것이다. 암의 경우, 유효량의 약물은 암 세포의 개수를 감소시킬 수 있고/있거나; 종양 크기를 감소시킬 수 있고/있거나; 주변 장기 내로의 암 세포 침윤을 억제할 수 있고/있거나 (즉, 어느 정도 느리게 하고 전형적으로는 정지시킴); 종양 전이를 억제할 수 있고/있거나 (즉, 어느 정도 느리게 하고 전형적으로는 정지시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제할 수 있고/있거나; 종양 치료를 허용할 수 있고/있거나, 장애와 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도 완화할 수 있다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 방지할 수 있고/있거나 이를 사망시킬 수 있다는 점에서, 이는 세포정지성(cytostatic) 및/또는 세포독성일 수 있다.

[0095] **"예방적 유효량"**은 원하는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 기간으로 이를 달성하는데 효과적인 양을 지칭한다. 필수적이지는 않지만 전형적으로, 예방 용량은 대상체에서 질환 이전에 또는 질환의 초기 단계에 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.

[0096] **"억제"** 또는 **"억제하다"**라는 용어는 임의의 표현형적 특징의 감소 또는 중지, 또는 이러한 특징의 발생률, 정도 또는 가능성의 감소 또는 중지를 지칭한다. 비제한적인 예시적인 억제는 종양 성장의 억제를 포함한다.

[0097] 치료제의 투여로부터의 이로움 또는 치료제의 투여에 대한 반응의 정황에서 본원에서 사용된 바와 같은 **"이로움"**, **"임상 이로움"**, **"반응성"**, 및 **"치료 반응성"**이라는 용어는 다양한 중점, 예를 들어, 질환 진행이 어느 정도 억제되는 것 (저속화 및 완전한 정지 포함); 질환 예외소드 및/또는 증상의 수의 감소; 병변 크기의 감소; 인접한 주변 장기 및/또는 조직 내로의 질환 세포 침윤의 억제 (즉, 감소, 저속화 또는 완전한 정지); 질환 확산의 억제 (즉, 감소, 저속화 또는 완전한 정지); 자가면역 반응의 감소 (이는 질환 병변의 퇴행 또는 폐지를 초래할 수 있지만 그럴 필요는 없다); 장애와 연관된 하나 이상의 증상이 어느 정도 완화되는 것; 치료 후의 무병을 나타내는 기간, 예를 들어, 무진행 생존의 증가; 전체 생존 증가; 더 높은 반응률; 및/또는 치료 후의 소정의 시점에서의 사망률 감소를 평가함으로써 측정될 수 있다.

[0098] 하나 이상의 추가적인 치료제**와 조합하여** 투여하는 것은 동반 투여 (동시 투여 포함) 및 임의 순서의 연속적 투여 (즉, 순차적 투여)를 포함한다.

- [0099] **"제약상 허용되는 담체"**는 대상체에게 투여하기 위한 **"제약 조성물"**을 함께 이루는 치료제와 함께 사용하기 위한 관련 분야에서 통상적인 비독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질, 제형 보조제, 또는 담체를 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 제형의 다른 성분들과 혼화성이다. 제약상 허용되는 담체는 사용된 제형에 적합하다. 예를 들어, 치료제가 경구 투여되는 경우, 담체는 겔 캡슐일 수 있다. 치료제가 피하 투여되는 경우, 담체는 이상적으로는 피부에 자극성이 없지 않고, 주사 부위 반응을 야기하지 않는다.
- [0100] **치료 조성물 및 방법**
- [0101] **FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 사용하여 암을 치료하는 방법**
- [0102] 일부 실시양태에서, 본 발명은 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이같은 암은 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 사용하는 치료에 대해 특히 반응성인 것으로 발견되었다. 따라서, 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은 치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 이같은 방법에서, 암에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 소라페닙, 및 악시티닙으로부터 선택된다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 본 발명은 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이러한 수준은 mRNA 수준이다. 일부 실시양태에서, 이러한 수준은 단백질 수준이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암을 치료하는 방법은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은 치료 유효량의 섬유모세포 성장 인자 수용체 1 (FGFR1) 세포의 도메인 (ECD) 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 치료 유효량의 하나 이상의 항혈관신생제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 투여 전에, 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 소라페닙, 및 악시티닙으로부터 선택된다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 암은 전립선암, 유방암, 결장직장암, 위암, 폐암, 뇌암, 난소암, 자궁내막암, 두경부암, 후두암, 간암, 신암, 교모세포종, 및 체장암으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 암은 유방암, 식도암, 및 폐암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신암, 예컨대 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간암, 예컨대 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 비-소세포 폐암 및 소세포 폐암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 폐암은 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 두경부암이다. 일부 실시양태에서, 두경부암은 두경부의 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 교모세포종, 및 중피종으로부터 선택된다. 일부 실시양

태에서, 암은 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종이다. 일부 실시양태에서, 암은 교모세포종이다.

[0105] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 서열 1 내지 4로부터 선택된 아미노산 서열을 지닌다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 서열 2 및 4로부터 선택된 아미노산 서열을 지닌다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 서열 5 및 6으로부터 선택된 아미노산 서열을 지닌다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 서열 6의 아미노산 서열의 FGFR1 ECD.339-Fc이다.

[0106] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 하나 이상의 추가적인 항암 요법과 함께 투여된다. 추가적인 항암 요법의 예는, 비제한적으로, 수술, 방사선조사 요법 (방사선요법), 생물요법, 면역요법, 및 화학요법, 또는 이러한 요법들의 조합을 포함한다. 또한, 세포독성제, 항혈관신생제 및 항증식제가 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자와 조합되어 사용될 수 있다. 임의의 방법 및 용도의 특정 측면에서, 본 발명은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 화학요법제를 대상체에게 투여하는 것에 의해 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체의 암은 이전에 치료된 적이 없다. 다양한 화학요법제가 본 발명의 조합 치료 방법 및 용도에서 사용될 수 있다. 구상되는 화학요법제의 예시적이고 비제한적인 목록이 본원에서 "정의" 하에 제공된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제(들)를 대상체에게 투여하는 것에 의해 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 VEGF 길항제를 대상체에게 투여하는 것에 의해 암을 치료하는 것을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 VEGF 길항제를 하나 이상의 화학요법제와 조합하여 대상체에게 투여하는 것에 의해 암을 치료하는 것을 제공한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및/또는 VEGF 트랩이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 또는 수니티닙으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 파조파닙, 소라페닙, 및 악시티닙으로부터 선택된다.

[0108] 일부 실시양태에서, 도세탁셀, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 독소루비신, 5-플루오로우라실 (5-FU), 류코보린, 페메트렉세드, 소라페닙, 수니티닙, 악시티닙, 파조파닙, 에토포시드, 토포테칸, VEGF 길항제, 항-VEGF 항체, VEGF 트랩, 아플리베르셉트, 및 베바시주맙으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 치료제와 조합하여 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법이 제공된다. 또 다른 예에서, 도세탁셀, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 독소루비신, 5-플루오로우라실 (5-FU), 류코보린, 페메트렉세드, 소라페닙, 수니티닙, 악시티닙, 파조파닙, 에토포시드, 토포테칸, VEGF 길항제, 항-VEGF 항체, VEGF 트랩, 아플리베르셉트, 및 베바시주맙으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 치료제와 조합하여 FGFR1-ECD.339-Fc를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, FGFR1-ECD.339-Fc 및 도세탁셀을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, FGFR1-ECD.339-Fc, 파클리탁셀, 및 카르보플라틴을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, FGFR1-ECD.339-Fc, 페메트렉세드, 및 시스플라틴을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 간암 (간세포 암종 포함), 신장암 (신세포 암종 포함), 교모세포종, 및 중피종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종이다. 일부 실시양태에서, 암은 교모세포종이다.

[0109] 일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 이전에 파조파닙, 베바시주맙, 악시티닙, 아플리베르셉트, 소라페닙, 및 수니티닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제로 치료된 것인, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 이전에 악시티닙, 파조파닙, 및 소라페닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제로 치료되었다. 일부 실시양태에서, 대상체는 이전에 파조파닙으로 치료되었다. 일부 실시양태에서, 대상체의 암은 파조파닙 치료 동안에 또는 파조파닙 치료 이후에 파조파닙-저항성이 되었다. 일부 실시양태에서, 파조파닙-저항성 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 파조파닙-저항성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 파조파닙 및 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함한다.

[0110] 일부 이같은 실시양태에서, 대상체는 VEGF-저항성 암에 걸려 있다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 암은 높은

수준의 FGF2를 발현하고/하거나 FGF2/VEGF 비가 1을 초과한다. 일부 실시양태에서, VEGF-저항성 암에 걸린 대상체는 이전에 파조파넵, 베바시주맵, 악시티넵, 아플리베르셉트, 소라페넵, 및 수니티닙으로부터 선택된 하나 이상의 치료제로 치료되었다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 치료제는 파조파넵 및 소라페넵으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 악시티넵과 조합되어 투여된다.

[0111]

일부 실시양태에서, 작용제 (단독이거나 또는 하나 이상의 추가적인 작용제와 조합됨)로의 완전한 치료 과정 또는 부분적인 치료 과정을 대상체가 받은 경우 대상체가 이전에 작용제로 치료된 것으로 간주된다. 일부 이같은 실시양태에서, 대상체는 작용제 또는 작용제들의 조합물에 반응하지 않았을 수 있거나, 또는 초기에는 작용제 또는 작용제들의 조합물에 반응하였을 수 있지만, 작용제 또는 작용제들의 조합물에 덜 반응성 있게 되었을 수 있거나 또는 비-반응성 있게 되었을 수 있다. 예를 들어, 치료 중인 암의 성장 및/또는 전이에 따라, 반응성이 결정될 수 있다.

[0112]

일부 실시양태에서, 암 (VEGF-저항성 암 포함)은 전립선암, 유방암, 결장직장암, 위암, 폐암, 뇌암, 난소암, 자궁내막암, 두경부암, 후두암, 간암, 신암, 교모세포종, 중피종, 및 췌장암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암 (VEGF-저항성 암 포함)은 신암, 예컨대 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암 (VEGF-저항성 암 포함)은 간암, 예컨대 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암 (VEGF-저항성 암 포함)은 중피종이다.

[0113]

일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 암은 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 것인, 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암에 걸린 대상체에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 투여하는 것을 포함하는, VEGF-저항성 고형 암에서 혈관 밀도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 폐암, 결장암, 간암, 유방암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 (예컨대 신세포 암종), 간암 (예컨대 간세포 암종), 교모세포종, 및 중피종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 신세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종이다.

[0114]

일부 실시양태에서, 관련 분야의 방법에 의해 혈관 밀도가 결정된다. 일부 실시양태에서, 실시예 11에 기술된 바와 같이 혈관 밀도가 결정된다. 일부 실시양태에서, 전체 중앙 샘플에서 혈관 밀도가 결정된다.

[0115]

FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)를 포함하는 제약 조성물이 특정 적응증에 대해 치료 유효량으로 투여된다. 전형적으로 치료 유효량은 치료되는 대상체의 체중, 대상체의 신체적 또는 건강 상태, 치료될 상태의 광범위성, 및/또는 치료되는 대상체의 연령에 좌우된다. 일반적으로, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 용량 당 약 50 μ g/체중 kg 내지 약 100 mg/체중 kg 범위의 양으로 투여될 것이다. 임의적으로, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 용량 당 약 100 μ g/체중 kg 내지 약 30 mg/체중 kg 범위의 양으로 투여될 수 있다. 또한 임의적으로, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 용량 당 약 0.5 mg/체중 kg 내지 약 20 mg/체중 kg 범위의 양으로 투여될 수 있다 (1.42 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산됨). 특정 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 약 8 mg/체중 kg 내지 약 20 mg/체중 kg의 용량으로 투여된다 (1.42 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산됨). 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 약 8 mg/체중 kg 내지 약 16 mg/체중 kg (또는 1.11 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산된 경우 약 10 mg/체중 kg 내지 약 20 mg/체중 kg)의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 약 8 mg/체중 kg, 약 10 mg/체중 kg, 약 11 mg/체중 kg, 약 12 mg/체중 kg, 약 13 mg/체중 kg, 약 14 mg/체중 kg, 약 15 mg/체중 kg, 약 16 mg/체중 kg, 약 17 mg/체중 kg, 약 18 mg/체중 kg, 약 19 mg/체중 kg, 또는 약 20 mg/체중 kg (1.42 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산됨)의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, FGFR1 융합 단백질은 1.11 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산된 바와 같은 약 10 mg/체중 kg의 용량으로 투여된다. 다른 실시양태에서, FGFR1 융합 단백질은 1.11 mL/mg*cm의 흡광 계수를 사용하여 계산된 바와 같은 약 20 mg/체중 kg의 용량으로 투여된다. FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자는 상기 용량 중 하나에서 또다른 용량까지의 범위로 투여될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 투여량이 1주일에 2번, 매주, 격주로, 매주 내지 격주 사이의 빈도로, 3주마다, 4주마다 또는 매달 투여될 수 있다.

[0116]

특정 실시양태에서, 사용된 흡광 계수 (EC)에 따라 2가지 방식으로 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자의

투여량이 계산될 수 있다. 흡광 계수는 단백질의 글리코실화가 고려되는지 여부에 따라 상이하다. 한 실시양태에서, FGFR1-ECD.339-Fc의 아미노산 조성을 기초로 하는 흡광 계수는, 예를 들어, 1.42 mL/mg*cm이다. 또 다른 실시양태에서, FGFR1-ECD.339-Fc의 아미노산 부분뿐만 아니라 탄수화물 부분도 고려되는 경우, 흡광 계수는 1.11 mL/mg*cm이다. 표 1에 제시된 바와 같이, 1.11 mL/mg*cm의 EC를 사용하는 FGFR1-ECD.339-Fc 용량의 계산은 계산된 용량을 28%만큼 증가시킨다. 2가지 흡광 계수를 사용하여 계산된 용량이 상이하지만, 투여된 약물의 물 농도 또는 실제 양은 동일하다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 개시된 용량은 글리코실화를 고려하지 않은 흡광 계수를 사용하여 각각 계산된다. 이러한 투여량을 FGFR1-ECD.339-Fc에 대한 글리코실화를 고려하는 흡광 계수를 사용하여 계산된 것과 비교하는 방법이 표 1에서 제시된다. 표 1에서 볼 수 있듯이, 본원에서 1.42 mL/mg*cm의 EC를 사용한 약 8 mg/kg (예를 들어, 7.8 및 8.0)의 투여량은 1.11 mL/mg*cm의 EC를 사용하여 계산했을 때 약 10 mg/kg (예를 들어 10.0 및 10.2)의 투여량에 상응한다. 본원에서 1.42 mL/mg*cm의 EC를 사용한 약 16 mg/kg (예를 들어 15.6 및 16.0 mg/kg)의 투여량은 1.11 mL/mg*cm의 EC를 사용하여 계산했을 때 약 20 mg/kg (예를 들어 20.0 및 20.5)의 투여량에 상응한다. 상기 "정의" 섹션에서 언급된 바와 같이, 본원에서 제공된 측정된 수는 근사값이고, 반올림된 추가적인 유효 숫자가 있는 값을 포함한다. 예를 들어, 8 mg/kg은 각각 8로 반올림된 유효 숫자가 2개인 값 예컨대 7.6, 7.8, 8.0, 8.2, 8.4, 및 8.45를 포함한다. 마찬가지로, 16 mg/kg과 같은 값은 16으로 반올림된 유효 숫자가 3개인 값, 예를 들어 15.6 및 16.0을 포함한다.

[0117] [표 1]

[0118] FGFR1-ECD.339-FC 용량의 변환

용량 ^a EC = 1.42 mL/mg*cm	용량 ^a EC = 1.11 mL/mg*cm
0.5	0.6
0.75	1.0
1.0	1.3
2.0	2.6
3.0	3.8
4.0	5.1
5.0	6.4
6.0	7.7
7.0	9.0
7.8	10.0
8.0	10.2
9.0	11.5
10.0	12.8
11.0	14.1
12.0	15.4
13.0	16.6
14.0	17.9
15.0	19.2
15.6	20.0
16.0	20.5
17.0	21.8
18.0	23.0
19.0	24.3
20.0	25.6
30.0	38.4

[0119]

[0120] ^a mg/kg으로 제시된 용량

[0121] FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 융합 분자, 및/또는 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 제약 조성물이 필요하다면 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 유효 용량의 치료 분자가 대상체에게 1회 이상 투여된다. 다양한 실시양태에서, 유효 용량의 치료 분자가 대상체에게 2개월마다 1회 이상, 1개월에 1회 이상, 1개월에 2회 이상, 1주일에 1회, 1주일에 2회, 또는 1주일에 3회로 투여된다. 다양한 실시양태에서, 유효 용량의 치료 분자가 대상체에게 1주일 이상, 1개월 이상, 3개월 이상, 6개월 이상 또는 1년 이상 동안 투여된다.

[0122] 특정 실시양태에서, FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 추가적인 치료제의 조합 투여는 별도의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하는 동반 투여 (동시 투여 포함), 뿐만 아니라 임의 순서의 연속 투여를 포함한다. 임의적으로, 양쪽 (모든) 활성 작용제가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 있다. FGFR1

ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)와 조합되어 투여되는 치료제의 치료 유효량은 의사 또는 수의사의 재량일 것이다. 치료될 상태의 최대 관리가 달성되도록 투여량 투여 및 조정이 행해진다. 용량은 사용될 치료제의 유형, 치료되는 특정 환자, 질환 단계, 및 치료 체계의 원하는 공격성과 같은 요인들에 추가적으로 좌우될 것이다.

[0123] 특정 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc) 및 항혈관신생제의 조합물로 환자가 치료된다. 일부 실시양태에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 VEGF 트랩 (예를 들어, 아플리베르셉트)이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 타이로신 키나제 억제제 (예를 들어, 파조파닙, 악시티닙, 소라페닙, 또는 수니티닙)이다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다. 일부 실시양태에서, VEGF 항체는 베바시주맙이다. 베바시주맙의 한 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 범위이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg 또는 15 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이같은 용량은 간헐적으로, 예를 들어, 매주, 2주마다, 또는 3주마다 투여될 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 (예를 들어, FGFR1-ECD.339-Fc)는 치료제의 권장 또는 처방 투여량 및/또는 빈도로 또 다른 치료제, 예컨대 화학요법제 또는 항혈관신생제와 조합되어 투여된다.

[0125] 일부 실시양태에서, 치료적 처치를 승인하는 것을 담당하는 기관, 예컨대 식품의약품에 의해 승인된 투여량으로 또는 제조사의 권장 투여량으로 추가적인 치료제가 투여된다.

[0126] 투여 경로 및 담체

[0127] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 정맥내 및/또는 피하 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 또 다른 경로, 예컨대 동맥내, 비경구, 비내, 근육내, 심장내, 뇌실내, 기관내, 불, 직장, 복막내, 피내, 국소, 경피 또는 경막내 경로에 의해 또는 다르게는 이식 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 하나 이상의 추가적인 치료제가 정맥내, 동맥내, 피하, 비경구, 비내, 근육내, 심장내, 심실내, 기관내, 불, 직장, 복막내, 피내, 국소, 경피 및 경막내 경로를 포함하는 다양한 경로에 의해 또는 다르게는 이식 또는 흡입에 의해 생체 내에서 투여될 수 있다. 각각의 대상 조성물이 단독으로 또는 조합되어 고체, 반고체, 액체 또는 기체 형태의 제제, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌약, 관장제, 주사, 흡입제 및 에어로졸로 제형될 수 있다.

[0128] 다양한 실시양태에서, FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 융합 분자, 및/또는 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 조성물이 제약상 허용되는 담체가 있는 제형으로 제공되고, 다양한 이러한 담체가 관련 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)]; [Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)]; [Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조). 비히클, 애주번트, 담체 및 희석제를 포함하는 다양한 제약상 허용되는 담체가 공개적으로 이용가능하다. 또한, 다양한 제약상 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정 및 완충 작용제, 장성 조정제, 안정화제, 습윤화제 등이 또한 공개적으로 이용가능하다. 특정한 비제한적인 예시적인 담체는 염수, 완충 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및 이들의 조합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 상기 정의 섹션에서 지시된 상표명 약물 또는 제네릭(generic) 등가물로서 제형된다. 일부 실시양태에서, 도세탁셀은 탁소테레® (사노피 아벤티스(Sanofi Aventis)) 또는 제네릭 등가물로서 제형된다.

[0129] 다양한 실시양태에서, FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 융합 분자, 및/또는 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 조성물이 이들을 수성 또는 비-수성 용매, 예컨대 식물성 또는 기타 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르, 또는 프로필렌 글리콜에, 원한다면 통상적인 첨가제 예컨대 용해제, 등장성 작용제, 현탁제, 유화제, 안정화제 및 방부제와 함께, 용해, 현탁 또는 유화시킴으로서 주사용으로 제형될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 예를 들어, 가압된 허용되는 추진제 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등을 사용하여, 조성물이 흡입용으로 제형될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 예컨대 생물분해성 또는 비-생물분해성 중합체로, 조성물이 지속 방출 마이크로캡슐 내로 제형될 수도 있다. 비제한적인 예시적인 생물분해성 제형은 폴리 락트산-글리콜산 중합체를 포함한다. 비제한적인 예시적인 비-생물분해성 제형은 폴리글리세린 지방산 에스테르를 포함한다. 이같은 제형을 제조하는 특정 방법들이, 예를 들어, EP 1 125 584 A1에 기술되어 있다.

[0130] FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 융합 분자, 및/또는 하나 이상의 추가적인 치료제의 1회 이상의 용량을 각각 함유하는

하나 이상의 용기를 포함하는 제약적 투약 팩이 또한 제공된다. 특정 실시양태에서, 단위 투여량이 제공되고, 이때 단위 투여량은 하나 이상의 추가적인 작용제와 함께 또는 이러한 작용제 없이 FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 융합 분자, 및/또는 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 조성물을 미리 정해진 양으로 함유한다. 특정 실시양태에서, 이같은 단위 투여량은 주사용으로 미리 충전된 1회용 주사기에서 공급된다. 다양한 실시양태에서, 단위 투여량 내에 함유된 조성물은 염수, 수크로스 등, 완충제, 예컨대 포스페이트 등을 포함할 수 있고/있거나, 안정적이고 효과적인 pH 범위 내에서 제형될 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, 조성물이 동결건조 분말로서 제공될 수 있고, 이는 적합한 액체, 예를 들어, 무균수의 첨가 시 재구성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 수크로스 및 아르기닌을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 단백질 응집을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및/또는 프로테오글리칸을 포함한다.

[0131] 일부 실시양태에서, 투약 팩은 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자, 및/또는 하나 이상의 항혈관신생제 (적합한 경우)의 투여 전에 암이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는지 여부를 결정하기 위한 설명서, 및/또는 암이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는지 여부를 결정하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 이같은 실시양태에서, 설명서는 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준이 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 치료 반응성을 나타낸다는 것을 나타낸다.

[0132] 본원에서 사용된 바와 같은 "설명서"라는 용어는 표지, 포장 삽입물, 전자 형태로 이용가능한 설명서 예컨대 컴퓨터 판독가능 매체 (예를 들어, 디스켓, 콤팩트 디스크, 또는 DVD), 인터넷을 통하는 것과 같이 원격으로 이용가능한 설명서 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 투약 팩이 설명서에 대한 액세스, 설명서에 대한 링크 (예컨대 유니폼 리소스 로케이터(uniform resource locator), 또는 url), 또는 설명서의 사본을 수득하기 위한 기타 메커니즘 (예컨대 리턴 리플라이 카드(return reply card), 설명서를 요청할 수 있는 물리적 주소, 설명서를 요청할 수 있는 이메일 주소, 설명서를 수득하기 위해 걸 수 있는 전화 번호 등)을 제공하는 경우, 투약 팩이 설명서를 포함하는 것으로 간주된다.

[0133] **FGFR1 ECD 및 FGFR1 ECD 융합 분자**

[0134] 비제한적인 예시적인 FGFR1 ECD는 전장 FGFR1 ECD, FGFR1 ECD 단편, 및 FGFR1 ECD 변이체를 포함한다. FGFR1 ECD는 신호 펩티드를 포함할 수 있거나 또는 신호 펩티드가 결여될 수 있다. 예시적인 FGFR1 ECD는 서열 1, 2, 3, 및 4로부터 선택된 아미노산 서열의 FGFR1 ECD를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0135] 비제한적인 예시적인 FGFR1 ECD 단편은 아미노산 339 (신호 펩티드 없이, 성숙형의 제1 아미노산으로부터 계수됨)에서 종결되는 인간 FGFR1 ECD를 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 단편은 아미노산 339과 아미노산 360 (신호 펩티드 없이, 성숙형의 제1 아미노산으로부터 계수됨) 사이의 아미노산에서 종결된다. 예시적인 FGFR1 ECD 단편은 서열 3 및 4로부터 선택된 아미노산 서열의 FGFR1 ECD 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0136] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 서열 1 내지 4로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD는 서열 1 내지 4로부터 선택된 서열로 이루어진다. FGFR1 ECD가 서열 1 내지 4로부터 선택된 서열로 "이루어지는" 경우, FGFR1 ECD는 다양한 번역후 변형, 예컨대 글리코실화 및 시알릴화를 함유하거나 또는 함유하지 않을 수 있다. 달리 말하면, FGFR1 ECD가 특정 아미노산 서열로 이루어지는 경우, 이는 연속적인 아미노산 서열 내에 추가적인 아미노산을 함유하지 않지만, 아미노산 측쇄, N-말단 아미노기, 및/또는 C-말단 카르복시기에 대한 변형을 함유할 수 있다.

[0137] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 신호 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자는 신호 펩티드가 결여된다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자의 FGFR1 ECD 부분은 서열 1 내지 4로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 융합 분자의 FGFR1 ECD 부분은 서열 1 내지 4로부터 선택된 서열로 이루어진다. FGFR1 ECD 융합 분자의 FGFR1 ECD 부분이 서열 1 내지 4로부터 선택된 서열로 "이루어지는" 경우, FGFR1 ECD 융합 분자의 FGFR1 ECD 부분은 다양한 번역후 변형, 예컨대 글리코실화 및 시알릴화를 함유하거나 또는 함유하지 않을 수 있다. 달리 말하면, FGFR1 ECD 융합 분자의 FGFR1 ECD 부분이 특정 아미노산 서열로 이루어지는 경우, 이는 연속적인 아미노산 서열 내에 FGFR1로부터의 추가적인 아미노산을 함유하지 않지만, 아미노산 측쇄, N-말단 아미노기, 및/또는 C-말단 카르복시기에 대한 변형을 함유할 수 있다. 추가로, FGFR1 ECD가 융합 분자에 연결되기 때문에, FGFR1 ECD의 N- 및/또는 C-말단에 추가적인 아미노산이 있을 수 있지만, 이러한 아미노산들은 FGFR1 서열로부터의 것이 아니라, 예를 들어 링커 서열 또는 융합 파트너 서열로부터의 것일 수 있다.

- [0138] 일부 실시양태에서, Fc, 알부민, 및 폴리에틸렌 글리콜로부터 FGFR1 ECD 융합 분자의 융합 파트너 부분이 선택된다. 비제한적인 예시적인 융합 파트너가 본원에서 논의된다.
- [0139] 본 발명가들은 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 투여가 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암에서 항혈관신생제 단독으로의 치료보다 더욱 효과적이라는 것을 발견하였다. 본 발명가들은 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여가 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암에서 효과적이라는 것을 추가로 발견하였다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여는 이같은 암에서 단독요법으로서 효과적이다.
- [0140] VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암은, 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖지만, 기준 샘플, 세포 또는 조직에 비교하여 FGF2 및 VEGF 양쪽 모두의 수준이 상승되었을 수 있다. VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암은, 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 FGF2 수준이 더 낮지만, 기준 샘플, 세포 또는 조직에 비교하여 FGF2 및 VEGF 양쪽 모두의 수준이 상승되었을 수 있다.
- [0141] 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 암에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준을 갖는 한, FGF2 수준이 기준 세포에서의 FGF2 수준보다 높거나 낮을 수 있고, VEGF 수준이 기준 세포에서의 VEGF 수준보다 높거나 낮을 수 있다. 유사하게, 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 암에서, VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준을 갖는 한, FGF2 수준이 기준 세포에서의 FGF2 수준보다 높거나 낮을 수 있고, VEGF 수준이 기준 세포에서의 VEGF 수준보다 높거나 낮을 수 있다.
- [0142] **융합 파트너 및 접합체**
- [0143] 본원에서 논의된 바와 같이, FGFR1 ECD가 하나 이상의 융합 파트너와 조합되어 FGFR1 ECD 융합 분자가 초래될 수 있다. 이러한 융합 파트너는 정제를 용이하게 할 수 있고, FGFR1 ECD 융합 분자는 생체 내에서 증가된 반감기를 나타낼 수 있다. FGFR1 ECD의 적절한 융합 파트너는, 예를 들어, 중합체, 예컨대 수용성 중합체, 면역 글로불린의 불변 도메인; 전체적인 인간 혈청 알부민 알부민 (HSA) 또는 이의 일부분; 페투인 A; 페투인 B; 류신 지퍼 도메인; 테트라렉틴 삼량체화 도메인; 만노스 결합 단백질 (만노스 결합 렉틴으로 또한 공지됨), 예를 들어, 만노스 결합 단백질 1; 및 Fc 영역 (본원에서 논의되고 미국 특허 번호 6,686,179에서 추가로 기술된 바와 같음)을 포함한다. 비제한적인 예시적인 FGFR1 ECD 융합 분자가, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890에 기술되어 있다.
- [0144] 폴리아미노산 또는 분지점 아미노산을 FGFR1 ECD에 부착시킴으로써 FGFR1 ECD 융합 분자가 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리아미노산은 (융합 분자를 통해 달성된 장점에 더하여) FGFR1 ECD의 순환 반감기를 증가시키는 역할을 하는 담체 단백질일 수 있다. 본 발명의 치료적 목적을 위해, 이상적으로는 이같은 폴리아미노산은 중화 항원성 반응 또는 기타 유해 반응이 없거나 또는 이를 일으키지 않는 것이어야 한다. 이같은 폴리아미노산은 혈청 알부민 (예컨대 HSA), 추가적인 항체 또는 이의 일부분, 예를 들어 Fc 영역, 페투인 A, 페투인 B, 류신 지퍼 핵 인자 에리트로이드 유도제-2 (NFE2), 신경망막 류신 지퍼, 테트라렉틴, 또는 기타 폴리아미노산, 예를 들어, 라이신으로부터 선택될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 폴리아미노산의 부착 위치는 N 말단 또는 C 말단, 또는 이들 사이의 기타 장소일 수 있고, 선택된 분자에 화학적 링커 모이어티에 의해 연결될 수도 있다.
- [0145] 중합체
- [0146] 중합체, 예를 들어, 수용성 중합체가 생리적 환경에서 전형적으로 발견되는 것과 같은 수성 환경에서의 FGFR1 ECD 융합 분자의 침전을 감소시키는 융합 파트너로서 유용할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 중합체는 치료 제품 또는 조성물의 제조를 위해 제약상 허용될 것이다.
- [0147] 적절한 임상적으로 허용되는 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜 (PVA), 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레인 무수물 공중합체, 폴리 (β-아미노산) (동중중합체 또는 무작위 공중합체), 폴리(n-비닐 피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 동중중합체 (PPG) 및 기타 폴리알킬렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (POG) (예를 들어, 글리세롤) 및 기타 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리옥시에틸화 소르비톨, 또는 폴리옥시에틸화 글루코스, 콜론산 또는 기타 탄수화물 중합체, 피콜(Ficoll), 또는 텍스트란 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

- [0148] 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은 다른 단백질을 유도체화시키는데 사용된 임의의 형태, 예컨대 모노-(C₁-C₁₀) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜을 포함하도록 의도된다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 이의 물에서의 안정성으로 인해 제작에서의 장점이 있을 수 있다.
- [0149] 본원에서 사용된 중합체, 예를 들어 수용성 중합체는 임의의 분자량의 중합체일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 평균 분자량이 약 2 kDa 내지 약 100 kDa이다 ("약"이라는 용어는 중합체 제제 내에서 일부 분자는 언급된 분자량보다 분자량이 더 크고 일부는 더 적을 것임을 나타냄). 각각의 중합체의 평균 분자량은 약 5 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 12 kDa 내지 약 25 kDa일 수 있다. 일반적으로, 분자량이 더 높을수록 또는 분지가 더 많을수록, 중합체:단백질 비가 더 높다. 원하는 치료 프로파일, 예를 들어, 지속 방출 기간, 생물학적 활성에 대한 효과 (있는 경우), 취급 용이성, 항원성의 정도 또는 결여, 및 FGFR1 ECD에 대한 중합체의 기타 공지된 효과에 따라 다른 크기가 또한 사용될 수 있다.
- [0150] 전형적으로, 본 발명에서 사용된 중합체는 폴리펩티드의 기능성 또는 항원성 도메인에 대한 효과를 고려하여 FGFR1 ECD에 부착된다. 일반적으로, 화학적 유도체화는 단백질을 활성화된 중합체 분자와 반응시키기 위해 사용되는 임의의 적절한 조건 하에 수행될 수 있다. 중합체를 활성 모이어티에 연결하는데 사용될 수 있는 활성화 기는 술포, 말레이미드, 술포히드릴, 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지리딘, 옥시란 및 5-피리딜을 포함한다.
- [0151] 전형적으로 본 발명의 중합체는 아미노산의 알파 (α) 또는 엡실론 (ε) 아미노기 또는 반응성 티올기에서 이중 폴리펩티드에 부착되지만, 적절한 반응 조건 하에 중합체 기에 부착되도록 충분히 반응성인 단백질의 임의의 반응성 기에 중합체 기가 부착될 수 있는 것이 또한 구상된다. 따라서, 중합체가 반응성 기, 예컨대 유리 아미노 또는 카르복실 기를 통해 FGFR1 ECD에 공유결합으로 결합될 수 있다. 유리 아미노기가 있는 아미노산 잔기는 라이신 잔기 N-말단 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 유리 카르복실기가 있는 것은 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기, 및 C-말단 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 반응성 티올기가 있는 것은 시스테인 잔기를 포함한다.
- [0152] 중합체, 예컨대 수용성 중합체와 접합된 용합 분자의 제조 방법은 각각 일반적으로 (a) 폴리펩티드가 하나 이상의 중합체에 부착되는 조건 하에 FGFR1 ECD를 중합체와 반응시키는 단계, 및 (b) 반응 생성물을 수득하는 단계를 수반할 것이다. 각각의 접합에 대한 반응 조건은 관련 분야에 공지된 조건 중 임의의 것 또는 이후에 개발되는 것으로부터 선택될 수 있지만, 변형된 단백질을 불활성화시킬 반응 조건 예컨대 온도, 용매 및 pH 수준에 대한 노출을 피하거나 제한하도록 선택되어야 한다. 일반적으로, 반응을 위한 최적의 반응 조건은 공지된 파라미터 및 원하는 결과를 기초로 경우에 따라 결정될 것이다. 예를 들어, 중합체:폴리펩티드 접합체의 비가 클수록, 접합된 생성물의 백분율이 더 크다. 최적의 비 (과량의 미반응 폴리펩티드 또는 중합체가 없는 반응 효율면에서는 원하는 유도체화 정도 (예를 들어, 모노-, 디-, 트리- 등), 선택된 중합체의 분자량, 중합체가 분지되었는지 또는 분지되지 않았는지 여부, 및 사용된 반응 조건과 같은 인자에 의해 결정될 수 있다. 중합체 (예를 들어, PEG) 대 폴리펩티드의 비는 일반적으로 1:1 내지 100:1의 범위일 것이다. 투석, 염석, 초미세여과, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피 및 전기영동을 특히 포함하는 표준 정제 기술에 의해 각각의 혼합물로부터 하나 이상의 정제된 접합체가 제조될 수 있다.
- [0153] N-말단이 화학적으로 변형된 FGFR1 ECD를 구체적으로 원할 수 있다. 분자량, 분지 등, 반응 혼합물 내의 중합체 대 FGFR1 ECD 분자의 비율, 수행될 반응의 유형, 및 선택된 N-말단이 화학적으로 변형된 FGFR1 ECD를 수득하는 방법에 의해 중합체를 선택할 수 있다. N-말단이 화학적으로 변형된 FGFR1 ECD 제제를 수득하는 방법 (필요하다면 이러한 모이어티를 다른 모노-유도체화 모이어티로부터 분리함)은 화학적으로 변형된 단백질 분자들의 집단으로부터의 N-말단이 화학적으로 변형된 FGFR1 ECD 물질의 정제에 의한 것일 수 있다.
- [0154] 특정 단백질 내의 유도체화에 이용가능한 상이한 유형의 1차 아미노기 (라이신 대 N-말단)의 차별적인 반응성을 이용하는 환원적 알킬화에 의해 선택적인 N-말단 화학적 변형이 달성될 수 있다. 적합한 반응 조건 하에, 카르보닐기-함유 중합체로의 N-말단에서의 단백질의 실질적으로 선택적인 유도체화가 달성된다. 예를 들어, 라이신 잔기의 ε-아미노기와 단백질의 N-말단 잔기의 α-아미노기 사이의 pKa 차이를 이용하도록 허용하는 pH에서 반응을 수행함으로써 중합체를 단백질의 N 말단에 선택적으로 부착시킬 수 있다. 이같은 선택적 유도체화에 의해, 단백질에 대한 중합체의 부착이 제어된다; 중합체와의 접합이 단백질의 N 말단에서 우세하게 일어나고, 다른 반응성 기, 예컨대 라이신 측쇄 아미노기의 유의한 변형이 발생하지 않는다. 환원적 알킬화를 사용할 때, 중합체는 상기 기술된 유형의 것일 수 있고, 단백질에 대한 커플링을 위한 단일 반응성 알데히드가 있어야 한다. 단일 반응성 알데히드를 함유하는 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 또한 사용될 수 있다.

- [0155] 한 실시양태에서, 본 발명은 모노- 또는 폴리- (예를 들어, 2-4개) PEG 모이어티를 포함하는 화학적으로 유도체화된 FGFR1 ECD를 구상한다. 이용가능한 PEG 반응 중 임의의 것에 의해 PEG화가 수행될 수 있다. PEG 단백질 생성물을 제조하는 방법은 일반적으로 (a) 단백질이 하나 이상의 PEG 기에 부착되는 조건 하에 폴리펩티드를 폴리에틸렌 글리콜 (예컨대 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체)과 반응시키는 단계; 및 (b) 반응 생성물(들)을 수득하는 단계를 포함할 것이다. 일반적으로, 최적의 반응 조건은 공지된 파라미터 및 원하는 결과를 기초로 경우에 따라 결정될 것이다.
- [0156] 다수의 PEG 부착 방법이 관련 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, EP 0 401 384; 문헌 [Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992)]; [Francis, Focus on Growth Factors, 3(2):4-10 (1992)]; EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; 및 PEG화와 관련된 본원에서 언급된 기타 간행물을 참조한다.
- [0157] 예를 들어, 반응성 폴리에틸렌 글리콜 분자와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 PEG화가 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 단백질 생성물은 PEG 기(들)가 아실 또는 알킬 기를 통해 부착된 PEG화 단백질을 포함한다. 이같은 생성물은 모노-PEG화 또는 폴리-PEG화 (예를 들어, 2-6개 또는 2-5개의 PEG 기를 함유하는 것)될 수 있다. 일반적으로 PEG 기는 아미노산의 α - 또는 ϵ -아미노기에서 단백질에 부착되지만, 적절한 반응 조건 하에 PEG 기에 부착되기에 충분히 반응성인 단백질에 부착된 임의의 아미노기에 PEG 기가 부착될 수 있는 것이 또한 구상된다.
- [0158] 아실화에 의한 PEG화는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 유도체의 활성 에스테르 유도체를 FGFR1 ECD와 반응시키는 것을 일반적으로 수반한다. 아실화 반응을 위해, 선택된 중합체(들)는 전형적으로 단일 반응성 에스테르기가 있다. 임의의 공지된 또는 이후에 발견된 반응성 PEG 분자가 PEG화 반응을 수행하는데 사용될 수 있다. 적절한 활성화된 PEG 에스테르의 예는 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 에스테르화된 PEG이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 아실화는 치료적 단백질과 중합체 예컨대 PEG 사이의 하기 유형의 결합을 비제한적으로 포함하는 것으로 구상된다: 아마이드, 카르바메이트, 우레탄 등 (예를 들어, 문헌 [Chamow, Bioconjugate Chem., 5:133-140 (1994)] 참조). 반응 조건은 현재 사용되는 것들 또는 이후에 개발되는 것들 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있지만, 변형될 폴리펩티드를 불활성화시킬 조건 예컨대 온도, 용매 및 pH를 피해야 한다.
- [0159] 아실화에 의한 PEG화는 일반적으로 폴리-PEG화 단백질을 초래할 것이다. 연결 결합은 아마이드일 수 있다. 생성물은 실질적으로 (예를 들어, > 95%) 모노-, 디-, 또는 트리-PEG화뿐일 수 있다. 그러나, 사용된 특정 반응 조건에 의존적인 양으로 PEG화 정도가 더 높은 일부 종이 형성될 수 있다. 원한다면, 투석, 염석, 초미세여과, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피 및 전기영동을 특히 포함하는 표준 정제 기술에 의해 더욱 정제된 PEG화 종이 혼합물 (특히 미반응 종)로부터 분리될 수 있다.
- [0160] 알킬화에 의한 PEG화는 환원제의 존재 하에 PEG의 말단 알데히드 유도체를 폴리펩티드와 반응시키는 것을 일반적으로 수반한다. 환원적 알킬화 반응을 위해, 선택된 중합체(들)는 단일 반응성 알데히드가 있어야 한다. 예시적인 반응성 PEG 알데히드는 수-안정성인 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 또는 이의 모노 C₁-C₁₀ 알콕시 또는 아릴옥시 유도체이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,252,714 참조).
- [0161] 마커
- [0162] 또한, 본 발명의 FGFR1 ECD가 마커 서열, 예컨대 융합된 폴리펩티드의 정제를 용이하게 하는 펩티드에 융합될 수 있다. 마커 아미노산 서열은 특히 pQE 벡터 (퀴아젠(Qiagen), 캐나다 온타리오주 미시소거)에서 제공되는 태그와 같은 헥사-히스티딘 펩티드일 수 있고, 다수의 이러한 것이 시판된다. 문헌 [Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:821-824 (1989)]에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 또 다른 펩티드 태그인 헤마글루티닌 (HA) 태그는 인플루엔자 HA 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응한다. (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)). 이러한 상기 융합체 중 임의의 것이 본원에 기술된 FGFR1 ECD를 사용하여 조작될 수 있다.
- [0163] 올리고머화 도메인 융합 파트너
- [0164] 다양한 실시양태에서, 올리고머화는 다가성, 증가된 결합 강도, 및 상이한 도메인들의 조합된 기능을 포함하지만 이에 한정되지 않는 일부 기능성 장점을 융합 단백질에 제공한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 올리고머화 도메인, 예를 들어, 이량체화 도메인을 포함한다. 예시적인 올리고머화 도메인은 알파-나선형 코일드-코일(coiled-coil) 도메인을 포함하는 코일드-코일 도메인; 콜라겐 도메인; 콜라겐-유사 도메인; 및 특정 면역글로불린 도메인을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 코일드-코일 폴리펩티드 융합 파트너는 테트라벡틴 코일드-코일 도메인; 연골 올리고머 매트릭스 단백질의 코일드-코일 도메인; 안지오펜에틴 코

일드-코일 도메인; 및 류신 지퍼 도메인을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 콜라겐 또는 콜라겐-유사 올리고머화 도메인은 콜라겐, 만노스 결합 렉틴, 폐 계면활성제 단백질 A 및 D, 아디포넥틴, 피콜린, 코글루티닌, 대식세포 스캐빈저 수용체, 및 에밀린에서 발견되는 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0165] 항체 Fc 면역글로불린 도메인 융합 파트너

[0166] 융합 파트너로서 사용될 수 있는 다수의 Fc 도메인이 관련 분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 Fc 면역글로불린 도메인이다. Fc 융합 파트너는 천연 발생 항체에서 발견되는 야생형 Fc, 이의 변이체 또는 이의 단편일 수 있다. 비제한적인 예시적인 Fc 융합 파트너는 인간 IgG, 예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 힌지(hinge) 및 CH2 및 CH3 불변 도메인을 포함하는 Fc를 포함한다. 추가적인 예시적인 Fc 융합 파트너는 인간 IgA 및 IgM을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, Fc 융합 파트너는, 예를 들어, IgG1 내에, C237S 돌연변이를 포함한다 (예를 들어, 서열 8 참조). 일부 실시양태에서, Fc 융합 파트너는 미국 특허 번호 6,900,292에 기술된 바와 같은, P331S 돌연변이가 있는 인간 IgG2의 힌지, CH2, 및 CH3 도메인을 포함한다. 특정한 예시적인 Fc 도메인 융합 파트너가 서열 8 내지 10에서 제시된다.

[0167] 알부민 융합 파트너 및 알부민-결합 분자 융합 파트너

[0168] 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 알부민이다. 예시적인 알부민은 인간 혈청 알부민 (HSA) 및 HSA의 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않고, 이는 자신이 융합되는 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 생체이용률을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 알부민-결합 분자, 예를 들어, 알부민에 결합하는 펩티드, 또는 알부민에 결합하는 지질 또는 기타 분자와 접합된 분자이다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,686,179에 기술된 바와 같이, HSA를 포함하는 융합 분자가 제조된다.

[0169] **융합 파트너의 예시적인 부착**

[0170] 공유결합으로 또는 비-공유결합으로 융합 파트너가 FGFR1 ECD의 N 말단 또는 C 말단에 부착될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 측쇄 (예를 들어, 시스테인, 라이신, 세린 또는 트레오닌의 측쇄)를 통해, N 말단 또는 C 말단 이외의 FGFR1 ECD 내의 장소에서 부착이 일어날 수도 있다.

[0171] 공유결합 또는 비-공유결합 부착 실시양태에서, 융합 파트너와 FGFR1 ECD 사이에 링커가 포함될 수 있다. 이같은 링커는 하나 이상의 아미노산 또는 화학적 모이어티로 구성될 수 있다. 융합 파트너를 FGFR1 ECD에 공유결합으로 부착시키는 예시적인 방법은 융합 파트너 및 FGFR1 ECD가 단일 아미노산 서열로서 번역되는 것 및 FGFR1 ECD에 대한 융합 파트너의 화학적 부착을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 융합 파트너 및 FGFR1 ECD가 단일 아미노산 서열로서 번역되는 경우, 추가적인 아미노산이 링커로서 융합 파트너와 FGFR1 ECD 사이에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 발현 구축물 내로 융합 파트너 및/또는 FGFR1 ECD를 클로닝하는 것을 용이하게 하도록, 링커가 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 기초로 선택된다 (예를 들어, 특정 제한 부위를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 융합 파트너를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 FGFR1 ECD를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이에 놓일 수 있고, 이때 제한 부위를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 짧은 아미노산 링커 서열을 코딩한다). 융합 파트너 및 FGFR1 ECD가 화학적 수단에 의해 공유결합으로 커플링되는 경우, 커플링 반응 동안에 다양한 크기의 링커가 전형적으로 포함될 수 있다.

[0172] 융합 파트너를 FGFR1 ECD에 비-공유결합으로 부착시키는 예시적인 방법은, 결합 쌍을 통한 부착을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 결합 쌍은 비오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘, 항체 및 이의 항원 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0173] **번역과 동시의 변형 및 번역후 변형**

[0174] 본 발명은, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질 분해성 절단, 또는 항체 분자 또는 기타 세포 리간드에 대한 결합에 의해, 번역 동안에 또는 번역 후에 차별적으로 변형된 FGFR1 ECD 및 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여를 포함한다. 시아노겐 브로마이드, 트립신, 키모트립신, 파파인, V8 프로테아제(protease)에 의한 특이적 화학적 절단; NABH₄; 아세틸화; 포르밀화; 산화; 환원; 및/또는 튜니카마이신의 존재 하에서의 대사적 합성을 포함하지만 이에 한정되지 않는 공지된 기술에 의해 수많은 화학적 변형 중 임의의 것이 수행될 수 있다.

[0175] 본 발명에 포함되는 추가적인 번역후 변형은, 예를 들어, N-연결 또는 O-연결 탄수화물 사슬, N-말단 또는 C-말단 끝부분의 프로세싱, 아미노산 골격으로의 화학적 모이어티의 부착, N-연결 또는 O-연결 탄수화물 사슬의 화학적 변형, 및 원핵생물 숙주 세포 발현의 결과로서의 N-말단 메티오닌 잔기의 부가 또는 결실을 포함한다.

FGFR1 ECD 및 FGFR1 ECD 융합 분자의 다양한 번역후 변형의 비제한적인 논의를, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890에서 확인할 수 있다.

[0176] **FGFR1 ECD 및 FGFR1 ECD 융합 분자 발현 및 생산 벡터**

[0177] FGFR1 ECD를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 제공된다. FGFR1 ECD 융합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 이같은 벡터는 DNA 벡터, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0178] 일부 실시양태에서, CHO 또는 CHO-유래 세포에서의 폴리펩티드의 발현에 최적화된 벡터가 선택된다. 예시적인 이같은 벡터가, 예를 들어, 문헌 [Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)]에 기술되어 있다.

[0179] 일부 실시양태에서, 인간을 포함하는 동물에서의 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 생체내 발현을 위해 벡터가 선택된다. 일부 이같은 실시양태에서, 폴리펩티드의 발현이 조직-특이적 방식으로 기능하는 프로모터의 제어 하에 놓인다. 예를 들어, 간-특이적 프로모터가, 예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2006/076288에 기술되어 있다. 다양한 발현 벡터의 비제한적인 논의를, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890에서 확인할 수 있다.

[0180] **숙주 세포**

[0181] 다양한 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 원핵생물 세포, 예컨대 박테리아 세포; 또는 진핵생물 세포, 예컨대 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 및 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 관련 분야에 공지된 절차에 따라 이같은 발현이 수행될 수 있다. 폴리펩티드를 발현시키는데 사용될 수 있는 예시적인 진핵생물 세포는 COS 세포 (COS 7 세포 포함); 293 세포 (293-6E 세포 포함); CHO 세포 (CHO-S 및 DG44 세포 포함); 및 NSO 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 특정한 원하는 번역후 변형을 일으키는 능력을 기초로 특정한 진핵생물 숙주 세포가 선택된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, CHO 세포는 293 세포에서 생산된 동일한 폴리펩티드보다 시알릴화 수준이 더 높은 FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 생산한다.

[0182] 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질-매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 관련 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 원하는 숙주 세포 내로의 핵산의 도입이 달성될 수 있다. 비제한적인 예시적인 방법이, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)]에 기술되어 있다. 관련 분야에 공지된 방법에 따라 원하는 숙주 세포 내에 핵산이 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. 숙주 세포 및 숙주 세포에서 폴리펩티드를 제조하는 방법의 비제한적인 논의를, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890에서 확인할 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 관련 분야에 공지된 방법에 따라, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자로 조작된 또는 이러한 핵산 분자가 형질도입된 동물에서 생체 내에서 폴리펩티드가 생산될 수 있다.

[0184] **FGFR1 ECD 폴리펩티드의 정제**

[0185] FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 관련 분야에 공지된 다양한 방법으로 정제할 수 있다. 이같은 방법은 친화력 매트릭스 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하는 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적절한 친화력 리간드는 FGFR1 ECD 또는 융합 파트너의 임의의 리간드를 포함한다. FGFR1에 결합하는 항체의 경우의 적절한 친화력 리간드는 FGFR1 자체 및 이의 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 추가로, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G, 또는 항체 친화력 칼럼이 Fc 융합 파트너에 결합하여 FGFR1 ECD 융합 분자를 정제하는데 사용될 수 있다. FGFR1 ECD에 대한 항체가 또한 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자를 정제하는데 사용될 수 있다. 소수성 상호작용 크로마토그래피, 예를 들어, 부틸 또는 페닐 칼럼 또한 일부 폴리펩티드를 정제하는데 적절할 수 있다. 다수의 폴리펩티드 정제 방법이 관련 분야에 공지되어 있다. 다양한 폴리펩티드 정제 방법의 비제한적인 논의를, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,678,890에서 확인할 수 있다.

[0186] **FGFR1 ECD 및/또는 FGFR1 ECD 융합 분자가 이로운 환자를 확인하는 방법**

[0187] 일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자의 투여가 이로운 수 있는 암에 걸린 환자를 확인하는 방법이 제공된다. 일부 이같은 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 샘플에서 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 수준의 FGF2를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상,

80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 것으로 결정된다. 일부 실시양태에서, VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준은 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자에 대한 암에 의한 치료 반응성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 암에 걸린 또는 암에 걸린 것으로 추정되는 환자로부터 샘플이 취해진다. 암 세포의 적어도 일부분에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 높은 FGF2 수준의 확인은 암에 걸린 또는 암에 걸린 것으로 추정되는 환자에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 요법이 이로울 수 있다는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 환자는 신장암, 간암, 교모세포종, 또는 중피종에 걸렸거나 또는 신장암, 간암, 교모세포종, 또는 중피종에 걸린 것으로 추정된다.

[0188]

일부 실시양태에서, FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제의 투여가 이로울 수 있는 암에 걸린 환자를 확인하는 방법이 제공된다. 일부 이같은 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 샘플에서 암 세포의 적어도 일부분이 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 수준의 FGF2를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 샘플의 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 mRNA 또는 단백질의 수준을 갖는 것으로 결정된다. 일부 실시양태에서, 암에 걸린 또는 암에 걸린 것으로 추정되는 환자로부터 샘플이 취해진다. 암 세포의 적어도 일부분에서의 VEGF 수준에 비교하여 더 낮은 FGF2 수준의 확인은 암에 걸린 또는 암에 걸린 것으로 추정되는 환자에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제 요법이 이로울 수 있다는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 환자는 신장암, 간암, 교모세포종, 또는 중피종에 걸렸거나 또는 신장암, 간암, 교모세포종, 또는 중피종에 걸린 것으로 추정된다.

[0189]

일부 실시양태에서, FGF2 수준 및/또는 VEGF 수준이 실험실에 의해 결정된다. 실험실은 병원 실험실 또는 병원과 독립적인 실험실일 수 있다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준 및/또는 VEGF 수준의 결정 후, 결정 결과가 의료진에게 전달된다. 일부 실시양태에서, FGF2 수준이 VEGF 수준에 비교되고, 비교 결과가 의료진에게 전달된다 (예를 들어, "VEGF보다 높은 FGF2", "VEGF보다 낮은 FGF2", "FGF2/VEGF > 1", "FGF2/VEGF < 1" 등). 일부 실시양태에서, 환자에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 요법이 이로울지 또는 환자가 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 요법에 대해 반응성일지 여부를 결정하기 위한 목적으로 결과가 전달된다. 일부 실시양태에서, 환자에게 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제 요법이 이로울지 또는 환자가 FGFR1 ECD 또는 FGFR1 ECD 융합 분자 및 하나 이상의 항혈관신생제 요법에 대해 반응성일지 여부를 결정하기 위한 목적으로 결과가 전달된다. 일부 실시양태에서, 의료진은 의사, 간호사, 병원 관리자 및 스태프 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0190]

단백질 수준을 결정하는 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역조직화학 ("IHC") 및 염색 프로토콜을 사용하여 샘플 내의 단백질의 수준을 검사한다. 조직 절편의 면역조직화학적 염색이 샘플 내의 단백질의 존재를 평가 또는 검출하는 신뢰할 수 있는 방법인 것으로 나타났다. 면역조직화학 기술은, 일반적으로 발색 또는 형광 방법에 의해, 원위치에서 세포 항원에 프로빙되어 이를 가시화하는 항체를 사용한다.

[0191]

통상적인 방법에 의해 조직 샘플이 고정될 수 있다 (즉, 보존될 수 있다) (예를 들어, 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3rd edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York]; [The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.] 참조). 관련 분야의 기술자는 고정제의 선택이 샘플이 조직학적으로 염색되거나 또는 다른 방식으로 분석되는 목적에 의해 결정된다는 것을 이해할 것이다. 관련 분야의 기술자는 고정 기간이 조직 샘플의 크기 및 사용된 고정제에 좌우된다는 것을 또한 이해할 것이다. 예를 들어, 중성 완충 포르말린, 보우인(Bouin) 또는 파라포르말데히드가 샘플을 고정시키는데 사용될 수 있다.

[0192]

일반적으로, 먼저 샘플이 고정된 후, 상승되는 농도의 일련의 알코올을 통해 탈수되고, 조직 샘플이 절편화될 수 있도록 파라핀 또는 기타 절편화 매질로 침윤되고 이에 포매된다. 대안적으로, 조직을 절편화하고, 수득된 절편을 고정시킬 수 있다. 예를 들어, 통상적인 방법으로 조직 샘플을 파라핀에 포매하여 프로세싱할 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"] 참조). 사용될 수 있는 파라핀의 예는 파라플라스트(Paraplast), 브롤로이드(Brolloid), 및 티슈메이(Tissuemay)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 조직 샘플이 포매되었으면, 마이크로톰 등으로 샘플을 절편화할 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"] 참조). 이러한 목적을 위한 예로서, 절편은 두께가 약 3 마이크로미터 내지 약 5 마

이크로미터 범위일 수 있다. 절편화되었으면, 절편을 여러 표준 방법에 의해 슬라이드에 부착시킬 수 있다. 슬라이드 접착제의 예는 실란, 젤라틴, 폴리-L-라이신 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 파라핀에 포매된 절편이 양으로 하전된 슬라이드 및/또는 폴리-L-라이신이 코팅된 슬라이드에 부착될 수 있다.

[0193]

파라핀이 포매 물질로 사용되었으면, 일반적으로 조직 절편에서 파라핀이 제거되고, 절편이 물에 재수화된다. 여러 통상적인 표준 방법에 의해 조직 절편에서 파라핀을 제거할 수 있다. 예를 들어, 크실렌 및 점진적으로 감소되는 농도의 일련의 알콜이 사용될 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"] 참조). 대안적으로, 시판되는 파라핀 제거 비-유기 작용제 예컨대 Hemo-De7 (CMS, 텍사스주 휴스턴)이 사용될 수 있다.

[0194]

일부 실시양태에서, 샘플 제조 이후에, IHC를 사용하여 조직 절편이 분석될 수 있다. 추가적인 기술 예컨대 형태학적 염색 및/또는 형광 원위치 혼성화와 조합되어 IHC가 수행될 수 있다. 2가지 일반적인 IHC 방법이 이용 가능하다; 직접적 및 간접적 검정법. 제1 검정법에 따르면, 표적 항원에 대한 항체의 결합이 직접적으로 결정된다. 이러한 직접적 검정법은 표지된 시약, 예컨대 형광 태그 또는 효소-표지 1차 항체를 사용하고, 이는 추가적인 항체 상호작용없이 가시화될 수 있다. 전형적인 간접적 검정법에서는, 미접합 1차 항체가 항원에 결합한 후, 표지된 2차 항체가 1차 항체에 결합한다. 2차 항체가 효소 표지에 접합된 경우, 발색 또는 형광 기질이 첨가되어 항원 가시화를 제공한다. 여러 2차 항체가 1차 항체 상의 상이한 에피토프와 반응할 수 있기 때문에 신호 증폭이 발생한다.

[0195]

면역조직화학에 사용되는 1차 및/또는 2차 항체는 검출가능한 모이어티로 전형적으로 표지될 것이다. 하기의 카테고리일 수 있는 다수의 표지가 이용 가능하다: (a) 방사성동위원소, 예컨대 ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, 및 ¹³¹I. 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)]에 기술된 기술을 사용하여 항체를 방사성동위원소로 표지할 수 있고, 섬광 카운팅을 사용하여 방사능을 측정할 수 있다. (b) 콜로이드성 금 입자. (c) 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), 텍사스 레드(Texas Red), 로다민, 플루오레세인, 단실, 리사민(Lissamine), 움벨리페론, 피코트리테린, 피코시아닌, 또는 시판되는 형광단 예컨대 스펙트럼 오렌지7(SPECTRUM ORANGE7) 및 스펙트럼 그린7(SPECTRUM GREEN7) 및/또는 상기의 것들 중 임의의 하나 이상의 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 형광 표지. 예를 들어 상기 문헌 [Current Protocols in Immunology]에 개시된 기술을 사용하여 항체에 형광 표지가 접합될 수 있다. 형광계를 사용하여 형광을 정량할 수 있다. (d) 다양한 효소-기질 표지가 이용 가능하고, 미국 특허 번호 4,275,149가 이들 중 일부의 리뷰를 제공한다. 일반적으로 효소는 발색 기질의 화학적 변형을 촉매하고, 다양한 기술을 사용하여 이를 측정할 수 있다. 예를 들어, 효소가 기질에서의 색 변화를 촉매할 수 있고, 이를 분광학적으로 측정할 수 있다. 대안적으로, 효소가 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광 변화를 정량하는 기술이 상기에서 기술된다. 화학발광 기질이 화학 반응에 의해 전자적으로 여기된 후, (예를 들어, 화학발광계를 사용하여) 측정될 수 있는 빛을 방출하거나 또는 형광 어셈블리에 에너지를 제공할 수 있다. 효소 표지의 예는 루시페라제(luciferase) (예를 들어, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제; 미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데히드로게나제(dehydrogenase), 우레아제(urease), 퍼옥시다제(oxidase) 예컨대 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRPO), 알칼리성 포스파타제(phosphatase), 베타-갈락토시다제, 글루코아밀라제(glucoamylase), 라이소자임, 당류 옥시다제(oxidase) (예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예컨대 유리카제(uricase) 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 효소를 항체에 접합시키는 방법이 문헌 [O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, Methods in Enzym. (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)]에 기술되어 있다.

[0196]

효소-기질 조합의 예는, 예를 들어, 하기를 포함한다: (i) 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRPO) + 기질로서의 수소 퍼옥시다제 (수소 퍼옥시다제가 염료 전구체 (예를 들어, 오르토펜렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 히드로클로라이드 (TMB))를 산화시킴); (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP) + 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트; 및 (iii) 베타-D-갈락토시다제 (베타-D-Gal) + 발색 기질 (예를 들어, p-니트로페닐-베타-D-갈락토시다제) 또는 형광발생 기질 (예를 들어, 4-메틸움벨리페릴-베타-D-갈락토시다제).

[0197]

다수의 기타 효소-기질 조합이 관련 분야의 기술자에게 이용 가능하다. 이들의 일반적인 리뷰를 위해, 미국 특허 번호 4,275,149 및 4,318,980을 참조한다. 때때로, 표지가 항체와 간접적으로 접합된다. 숙련된 기술자는 이를 달성하기 위한 다양한 기술을 알 것이다. 예를 들어, 항체가 비오틴과 접합될 수 있고, 상기 언급된 4가

지 광범위한 표지 카테고리 중 임의의 것이 아비딘과 접합될 수 있거나, 또는 반대의 경우도 가능하다. 비오틴은 아비딘에 선택적으로 결합하고, 따라서 이러한 간접적인 방식으로 표지가 항체와 접합될 수 있다. 대안적으로, 표지와 항체의 간접적인 접합을 달성하기 위해, 항체가 소형 합텐과 접합되고, 상기 언급된 여러 표지 유형 중 하나가 항-합텐 항체와 접합된다. 따라서, 표지와 항체의 간접적인 접합이 달성될 수 있다.

[0198] 상기 논의된 샘플 제조 절차 이외에, IHC 이전, IHC 동안 또는 IHC 이후의 조직 절편의 추가적인 처리를 원할 수 있다. 예를 들어, 에피토프 복구 방법, 예컨대 조직 샘플을 시트레이트 완충제에서 가열하는 것이 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)] 참조).

[0199] 임의적인 차단 단계 후, 1차 항체가 조직 샘플 내의 표적 단백질 항원에 결합하도록 충분한 기간 동안 적절한 조건 하에 조직 절편을 1차 항체에 노출시킨다. 이를 달성하기 위한 적합한 조건은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있다. 상기 논의된 검출가능한 표지 중 어느 하나를 사용함으로써 항체가 샘플에 결합하는 정도를 결정한다. 일부 실시양태에서, 표지는 발색 기질 예컨대 3,3'-디아미노벤지딘 발색원의 화학적 변형을 촉매하는 효소 표지 (예를 들어 HRPO)이다. 한 실시양태에서, 1차 항체에 특이적으로 결합하는 항체에 효소 표지가 접합된다 (예를 들어, 1차 항체는 토끼 폴리클로날 항체이고, 2차 항체는 염소 항-토끼 항체이다).

[0200] 이렇게 제조된 검체를 슬라이드에 놓고, 커버슬립을 덮을 수 있다. 그 후, 예를 들어, 현미경을 사용하여 슬라이드 평가를 결정하고, 관련 분야에서 일상적으로 사용되는 염색 강도 기준을 사용할 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, IHC가 사용되는 경우에, 세포 또는 세포 선집 내의 FGF2 및/또는 VEGF의 수준을 결정하기 위해 계단식 염색 시스템이 사용된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 염색되지 않음, 1+, 2+, 및 3+의 4단 시스템이 사용되고, 이때 1+, 2+, 및 3+은 증가되는 수준의 염색을 각각 나타낸다. 일부 실시양태에서, FGF2 염색이 VEGF 염색보다 높은 단계에 있는 경우에, VEGF에 비교하여 더 높은 수준의 FGF2가 확인된다. 일부 실시양태에서, FGF2 염색 및 VEGF 염색이 동일한 단계에 있지만, 조직학자가 더 큰 중앙 면적에 VEGF 염색보다 FGF2 염색이 있는 것으로 결정한 경우에, VEGF에 비교하여 더 높은 수준의 FGF2가 확인된다. 일부 실시양태에서, FGF2 염색이 VEGF 염색보다 낮은 단계에 있는 경우에, VEGF에 비교하여 더 낮은 수준의 FGF2가 확인된다. 일부 실시양태에서, FGF2 염색 및 VEGF 염색이 동일한 단계에 있지만, 조직학자가 더 큰 중앙 면적에 FGF2 염색보다 VEGF 염색이 있는 것으로 결정한 경우에, VEGF에 비교하여 더 낮은 수준의 FGF2가 확인된다. 관련 분야의 기술자는 특정 IHC 검정법 (특정 항체 포함), 세포 유형 등에 따라 VEGF에 비교하여 더 높은 수준 또는 더 낮은 수준의 FGF2를 나타내는 염색 수준을 결정할 수 있다.

[0202] mRNA 수준을 결정하는 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다. 세포 내의 mRNA의 평가 방법이 주지되어 있고, 예를 들어, 상보적 DNA 프로브를 사용하는 혼성화 검정법 (예컨대 FGF2 또는 VEGF에 대해 특이적인 표지된 리보 프로브를 사용하는 원위치 혼성화, 노던 블롯, 및 관련 기술), 및 다양한 핵산 증폭 검정법 (예컨대 FGF2 및/또는 VEGF에 대해 특이적인 상보적 프라이머를 사용하는 RT-PCR 및 기타 증폭 유형 검출 방법, 예를 들어, 분지형 DNA, SISBA, TMA 등)을 포함한다.

[0203] 노던, 도트 블롯 또는 PCR 분석을 사용하여 포유동물로부터의 조직 또는 세포 샘플을 mRNA에 대해 편리하게 결정할 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 검정법 예컨대 정량적 PCR 검정법이 관련 분야에 주지되어 있다. 일부 실시양태에서, mRNA 수준은 실시간 qRT-PCR을 사용하여 정량된 수준이다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 내의 표적 mRNA를 검출하는 방법은 하나 이상의 프라이머를 사용하여 역전사에 의해 샘플로부터 cDNA를 생산하는 단계; 이렇게 생산된 cDNA를 표적 폴리뉴클레오타이드를 센스 및 안티센스 프라이머로 사용하여 증폭시켜, 내부의 표적 cDNA를 증폭시키는 단계; 및 증폭된 표적 cDNA의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 또한, 이같은 방법은 (예를 들어, 액틴 패밀리 구성원과 같은 "살림" 유전자의 비교 대조군 mRNA 서열의 수준을 동시에 검사함으로써) 생물학적 샘플 내의 표적 mRNA의 수준을 결정하도록 허용하는 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다. 임의적으로, 증폭된 표적 cDNA의 서열을 결정할 수 있다.

[0204] 본 발명의 임의적인 방법은 마이크로어레이 기술에 의해 조직 또는 세포 샘플 내의 mRNA, 예컨대 표적 mRNA를 검사 또는 검출하는 프로토콜을 포함한다. 핵산 마이크로어레이를 사용하여, 테스트 및 대조군 조직 샘플로부터의 테스트 및 대조군 mRNA 샘플을 역전사하고 표지하여 cDNA 프로브를 생성시킨다. 그 후, 프로브를 고체 지지체 상에 고정된 핵산들의 어레이에 혼성화시킨다. 어레이는 어레이의 각각의 구성원의 서열 및 위치가 공지되도록 구성된다. 표지된 프로브와 특정 어레이 구성원의 혼성화는 프로브가 유래된 샘플이 이러한 유전자를 발현한다는 것을 나타낸다. 질환 조직의 차등적 유전자 발현 분석은 유용한 정보를 제공할 수 있다. 마이크로어레이 기술은 핵산 혼성화 기술 및 전산화 기술을 사용하여 단일 실험에서 수천개의 유전자의 mRNA 발현 프로파일을 평가한다. (예를 들어, 2001년 10월 11일에 공개된 WO 01/75166을 참조하고; 어레이 제작의 논의에 대

해서, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,700,637, 미국 특허 번호 5,445,934, 및 미국 특허 번호 5,807,522, 문헌 [Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996)]; [Cheung, V. G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999)]을 참조한다). DNA 마이크로어레이는 유리 또는 기타 기판 상에서 직접 합성되거나 또는 이에 스폿팅(spotting)된 유전자 단편들을 함유하는 미니어치 어레이이다. 일반적으로 수천개의 유전자가 단일 어레이에서 표시된다. 전형적인 마이크로어레이 실험은 하기의 단계들을 수반한다: 1) 샘플로부터 단리된 RNA로부터의 형광 표지된 표적의 제조, 2) 표지된 표적의 마이크로어레이로의 혼성화, 3) 어레이의 세정, 염색 및 스캐닝, 4) 스캐닝된 영상의 분석 및 5) 유전자 발현 프로파일의 생성. 현재 2가지 주요 유형의 DNA 마이크로어레이가 사용되고 있다: 올리고뉴클레오타이드 (일반적으로 25량체 내지 70량체) 어레이 및 cDNA로부터 제조된 PCR 생성물을 함유하는 유전자 발현 어레이. 어레이 형성에서, 올리고뉴클레오타이드가 미리 제작되어 표면 상에 스폿팅될 수 있거나, 또는 직접적으로 표면 상에서 합성될 수 있다 (원위치). 일부 실시양태에서, DNA 마이크로어레이는 단일-뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 마이크로어레이, 예를 들어, 아피메트릭스(Affymetrix)® SNP 어레이 6.0이다.

[0205]

아피메트릭스 진칩(Affymetrix GeneChip)® 시스템은 유리 표면 상에서의 올리고뉴클레오타이드의 직접적인 합성에 의해 제작된 어레이를 포함하는 시판되는 마이크로어레이 시스템이다. 프로브/유전자 어레이: 올리고뉴클레오타이드, 일반적으로는 25량체가 반도체를 기초로 하는 포토리소그래피 및 고체상 화학적 합성 기술의 조합에 의해 유리 웨이퍼 상으로 직접적으로 합성된다. 각각의 어레이는 400,000개까지의 상이한 올리고를 함유하고, 각각의 올리고는 수백만개의 카피로 존재한다. 올리고뉴클레오타이드 프로브가 어레이 상의 알려진 위치에서 합성되기 때문에, 아피메트릭스 마이크로어레이 스위트(Affymetrix Microarray Suite) 소프트웨어에 의해 유전자 신원 및 상대적인 수준의 관점에서 혼성화 패턴 및 신호 강도가 해석될 수 있다. 각각의 유전자가 일련의 상이한 올리고뉴클레오타이드 프로브에 의해 어레이 상에서 표시된다. 각각의 프로브 쌍은 완전 매치 올리고뉴클레오타이드 및 미스매치 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다. 완전 매치 프로브는 특정 유전자에 정확하게 상보적인 서열을 지니고, 따라서 유전자의 발현을 측정한다. 미스매치 프로브는 중앙 염기 위치에서 단일 염기 치환에 의해 완전 매치 프로브와 상이하여, 표적 유전자 전사체의 결합을 방해한다. 이는 완전 매치 올리고에 대해 측정된 신호에 기여하는 배경 및 비-특이적 혼성화를 결정하는 것을 돕는다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어는 미스매치 프로브의 혼성화 강도를 완전 매치 프로브의 강도에서 차감하여 각각의 프로브 세트에 대한 절대적 또는 특이적 강도 값을 결정한다. 프로브는 진뱅크(Genbank) 및 기타 뉴클레오타이드 보관소로부터의 현재의 정보를 기초로 선택된다. 이러한 서열은 유전자의 3' 끝부분의 독특한 영역을 인식하는 것으로 여겨진다. 진칩 혼성화 오븐(GeneChip Hybridization Oven) ("회전식(rotisserie)" 오븐)이 한번에 64개까지의 어레이의 혼성화를 수행하는데 사용된다. 플루이드스(fluidics) 스테이션에서 프로브 어레이의 세정 및 염색이 수행된다. 이는 완전히 자동화되고, 4개의 모듈을 함유하며, 각각의 모듈이 1개의 프로브 어레이를 보유한다. 미리 프로그래밍된 플루이드스 프로토콜을 사용하여 마이크로어레이 스위트 소프트웨어를 통해 각각의 모듈이 독립적으로 제어된다. 스캐너는 프로브 어레이에 결합된 표지된 cRNA에 의해 방출되는 형광 강도를 측정하는 공초점 레이저 형광 스캐너이다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어가 있는 컴퓨터 워크스테이션이 플루이드스 스테이션 및 스캐너를 제어한다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어는 프로브 어레이에 대한 미리 프로그래밍된 혼성화, 세정, 및 염색 프로토콜을 사용하여 8개까지의 플루이드스 스테이션을 제어할 수 있다. 또한 이러한 소프트웨어는 혼성화 강도 데이터를 취득하고, 적합한 알고리즘을 사용하여 이를 각각의 유전자에 대한 존재/부재 신호(call)로 전환한다. 마지막으로, 이러한 소프트웨어는 비교 분석에 의해 실험들 간의 유전자 발현의 변화를 검출하고, 출력값을 .txt 파일의 포맷으로 만들며, 이는 추가적인 데이터 분석을 위해 다른 소프트웨어 프로그램과 함께 사용될 수 있다.

[0206]

일부 실시양태에서, 예를 들어 정량적 RT-PCR가 사용되는 경우, FGF2와 VEGF 사이에서 역치 사이클 수가 비교되고, 더 낮은 역치가 더 높은 수준의 각각의 mRNA를 나타낸다. 비제한적인 예로서, 일부 실시양태에서, FGF2 mRNA 및 VEGF mRNA 수준이 분석되고, FGF2에 대한 역치 사이클 수 (Ct)는 28이고, VEGF에 대한 Ct는 30이면, FGF2가 VEGF에 비교하여 수준이 더 높다. 다양한 실시양태에서, 임의 유형의 정량적 또는 반-정량적 분석 방법에 대해 유사한 비교가 수행될 수 있다.

[0207]

일부 실시양태에서, FGF2 수준 및 VEGF 수준 양쪽 모두가 비교 전에 정규화된다. 일부 실시양태에서, 이같은 정규화는 수준들이 동시에 및/또는 동일한 검정법 반응에서 결정되지 않은 경우에 FGF2 수준 대 VEGF 수준의 비교를 허용할 수 있다. 관련 분야의 기술자는 검정법에 따라 적절한 정규화 mRNA, 단백질 또는 기타 인자를 선택할 수 있다.

[0208]

실시예

[0209] 하기 논의된 실시예는 순수하게 본 발명을 예시하는 것으로 의도되고, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 실시예는 하기의 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험이라는 것을 나타내도록 의도되지 않는다. 상기 제공된 일반적인 설명을 고려하여 다양한 기타 실시양태가 실행될 수 있는 것으로 이해된다. 사용된 숫자 (예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 확실히 하기 위해 노력하였으나, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이며, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다.

[0210] **실시예 1: 암 세포주에서의 FGF2 및 VEGF 수준**

[0211] 인간 간세포 암종 (HCC) 및 신세포 암종 (RCC) 세포주에서의 FGF2 및 VEGF의 상대적인 수준을 문헌 [Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia] (CCLE; www.broadinstitute.org/ccle/home)로부터의 데이터를 사용하여 평가하였다. CCLE는 1000개 이상의 인간 암 세포주에 대한 게놈 및 트랜스크립톰(transcriptome) 데이터를 제공하는 공개적으로 입수가능한 데이터베이스이다. 아피메트릭스 U133 플러스 2.0 마이크로어레이를 수행함으로써 유전자 발현값이 생성되었고, 로버스트 멀티-어레이 애버리지(Robust Multi-array Average) (RMA)를 사용하여 각각의 프로브 세트에 대해 미처리(raw) 아피메트릭스 CEL 파일이 단일 값으로 전환되었으며, 분위수 정규화(quantile normalization)를 사용하여 값이 정규화되었다. FGF2의 경우, 검사된 모든 암 세포에 걸친 평균 발현값은 6.0이었고, 중앙값은 5.4였다. 신장암 세포주는 8.36의 평균 FGF2 발현값을 나타냈고, 중앙값은 8.47이었다. 생체 내에서 성장하는 것으로 공지된 RCC 세포주를 검사했을 때, ACHN 및 Caki-1이 각각 9.79 및 10.67의 값으로 FGF2 수준이 "높은" 것으로 선택되었다. RCC 세포주 Caki-2 및 786-0은 값이 8.26 및 7.20이었고, 따라서 "낮은" FGF2 수준을 나타내는 것으로 간주되었다. A498은 FGF2 발현값이 9.85였지만 (이러한 조직 유형에 대한 평균값보다 높음), 이러한 세포주는 또한 높은 VEGF 발현을 나타냈고, FGF2/VEGF 비가 <1이었다 (하기 논의됨). 간암 세포주의 경우, FGF2의 평균 및 중앙값 발현값은 각각 6.53 및 6.81이었다.

[0212] HCC 세포주 SK-Hep-1은 FGF2 값이 9.45였고, 따라서 FGF2 수준이 "높은" 것으로 간주되었다.

[0213] CCLE를 사용하여 VEGF에 대한 상대적 발현값을 유사하게 평가하였다. 검사된 모든 암 세포에 걸친 평균 VEGF 값은 8.13이었고, 중앙값은 8.06이었다. 신장암 세포주는 평균 VEGF 값이 9.24이었고, 중앙값은 9.38이었다. RCC 세포주 A498 및 786-0은 VEGF 값이 9.77 및 9.39이었고, 따라서 VEGF 수준이 "높은" 것으로 간주되었다. RCC 세포주 ACHN 및 Caki-1은 VEGF 값이 7.19 및 7.53이었고, 따라서 VEGF 수준이 "낮은" 것으로 간주되었다.

[0214] HCC 세포주는 8.40의 평균 VEGF 값을 나타냈고, 중앙값은 8.17이었다. HCC 세포주 SK-Hep-1 세포는 VEGF 값이 7.03이었고, 따라서 VEGF 수준이 "낮은" 것으로 간주되었다.

[0215] 또한, CCLE 발현 값을 이용하여 이러한 RCC 및 HCC 세포주에서의 FGF2 대 VEGF의 비를 계산하였다. FGF2/VEGF 비가 >1인 세포주는 RCC 세포주 ACHN 및 Caki-1 및 HCC 세포주 SK-Hep-1을 포함한 한편, 비의 값이 1 이하인 세포주는 RCC 세포주 A498, Caki-2, 및 786-0을 포함하였다.

[0216] 표 2 및 3은 각각의 암 세포주에서의 FGF2 및 VEGF mRNA 수준, 및 FGF2/VEGF 수준의 비를 나타낸다. 표 2의 세포주는 인간 신세포 암종으로부터 유래되고, 표 3의 세포주는 인간 간세포 암종으로부터 유래된다.

[0217] [표 2]

[0218] RCC 세포주

세포주	FGF2	VEGF	FGF2/VEGF
Caki-1	10.67	7.53	1.42
ACHN	9.79	7.19	1.36
A-498	9.85	9.77	1.01
Caki-2	8.26	8.61	0.96
786-0	7.20	9.39	0.77
RCC 평균	8.36	9.24	0.93
CCLE 평균	6.00	8.13	0.75

[0219]

[0220] [표 3]

[0221] HCC 세포주

세포주	FGF2	VEGF	FGF2/VEGF
SK-Hep-1	9.45	7.03	1.34
SNU182	9.32	5.86	1.59
HLF	9.74	7.9	1.23
Hep3B	5.17	8.33	0.62
PLC/PRF/5	4.76	7.78	0.61
HepG2	4.62	8.60	0.54
Huh7	4.19	7.83	0.53
HCC 평균	6.53	8.40	0.80
CCLE 평균	6.00	8.13	0.75

[0222]

[0223] 이러한 세포주들이 FGF2/VEGF 비가 >1인 세포주 (일부 실시양태에서, "높은 FGF2, 낮은 VEGF"인 것으로 간주됨), 및 FGF2/VEGF 비가 <1인 세포주 (일부 실시양태에서, "낮은 FGF2, 높은 VEGF"인 것으로 간주됨)의 2개의 군으로 분할되었다.

[0224] 실시예 2: ACHN 이종이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc 및 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여

[0225] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈(Charles River Laboratories) (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 투명 세포 신장 암종 (RCC) 세포주 ACHN을 ATCC (버지니아주 머내서스; 카탈로그 번호 CRL-1611)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. ACHN 세포를 이글 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium) (EMEM)에서 배양하였다. 10% 열-불활성화 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액을 배지에 보충하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37°C에서 성장시켰다.

[0226] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭젤(Matrigel)을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리(free) 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 5×10⁷개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 5×10⁶개의 세포/100 μl/마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. ACHN 종양이 종양 크기 (mm) = (폭 (mm) × 길이 (mm))²/2의 식에 따라 100 mm³의 평균 크기에 도달하면, 마우스를 분류 및 무작위화하고 (n=10), 처리를 시작하였다.

[0227] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 파조파넵 (보트리엔트(Votrient)®)을 매일 경구 위관을 통해 100 mg/kg으로 투약하였고, 비히클이 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. 종양이 100 mm³였을 때 FP-1039 처리를 시작하였고, 이어서, 종양이 약 450 mm³에 도달했을 때 FP-1039로 처리된 종양 군의 절반에서 파조파넵 공동-처리를 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 2000 mm³를 초과했을 때 또는 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0228] $P < 0.05$ 이면, FP-1039 및/또는 파조파넵으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 계산된 종양 부피의 비대응(unpaired), 양측(two-tailed) t-테스트 분석을 사용하여 P -값이 계산되었다.

[0229] 도 1은 이러한 실험의 결과를 나타낸다. ACHN 이종이식편 모델 (높은 FGF2, 낮은 VEGF; FGF2/VEGF = 1.36; 표 2 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 반응하였다. 제63일에 시작된 파조파넵 투여는 종양 성장의 더 큰 억제제를 초래하는 것으로 보였다. 도 1A를 참조한다. 도 1B에 나타난 바와 같이, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 단독이 제63일에 51% 종양 성장 억제 ($p < 0.0001$)를 초래하였다. 파조파넵 및 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")의 조합은 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 단독보다 더 큰 종양 성장 억제를 초래하는 것으로 보였지만, 이러한 결과는 통계적 유의성에 도달하지 않았다 ($p = 0.0552$). 도 1C를 참조한다. 이러한 분

식은 높은 FGF2 및 낮은 VEGF (비 = 1.36, 표 2 참조)의 ACHN 이종이식편 모델에서 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 종양 성장을 유의하게 감소시켰음을 실연하였다.

[0230] **실시예 3: 786-0 이종이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc 및 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**

[0231] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 투명 세포 신장 암종 (RCC) 세포주 786-0을 ATCC (버지니아주 머내서스; 카탈로그 번호 CRL-1932)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. 786-0을 10% 열-불활성화 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액이 보충된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37°C에서 성장시켰다.

[0232] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 5×10^7 개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 5×10^6 개의 세포/100 μ l/마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. 786-0 종양이 종양 크기 (mm³) = (폭 (mm) × 길이 (mm))²/2의 식에 따라 100 mm³의 평균 크기에 도달하면, 마우스를 분류 및 무작위화하고 (n=10), 처리를 시작하였다.

[0233] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 파조파넵 (보트리엔트®)을 매일 경구 위관을 통해 100 mg/kg으로 투약하였고, 비히클이 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. FP-1039 및 파조파넵 투약을 동시에 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 2000 mm³를 초과했을 때 또는 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0234] $P < 0.05$ 이면, FP-1039 및/또는 파조파넵으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 계산된 종양 부피의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P-값이 계산되었다.

[0235] 도 2는 이러한 실험의 결과를 나타낸다. 786-0 이종이식편 모델 (낮은 FGF2, 높은 VEGF; FGF2/VEGF = 0.77; 표 2 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 반응하지 않았다. 도 2A 및 2B를 참조한다. 대조적으로, 786-0 이종이식편 모델은 단일 요법으로서의 파조파넵에 반응하였다. 도 2A-C를 참조한다. 놀랍게도, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵의 조합이 파조파넵 단독보다 더 큰 효능을 나타냈다 (제86일의 $p=0.0046$ 및 제97일의 $p=0.0022$). 상기문헌을 참조한다. 이러한 분석은 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 낮은 FGF2 및 높은 VEGF (비 = 0.77, 표 2 참조)의 786-0 이종이식편 모델에서 종양 성장을 억제하지 않았지만, 파조파넵은 이러한 모델에서 효과적이었음을 실연하였다. 그러나, 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc는 파조파넵 단독보다 786-0 이종이식편 모델에서 종양 성장의 더 큰 억제를 나타냈다.

[0236] **실시예 4: A498 이종이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc 및 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**

[0237] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 투명 세포 신장 암종 (RCC) 세포주 A498을 ATCC (버지니아주 머내서스; 카탈로그 번호 HTB-44)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. A498 세포를 10% 열-불활성화 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액이 보충된 이글 최소 필수 배지 (EMEM)에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37°C에서 성장시켰다.

[0238] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 5×10^7 개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 5×10^6 개의 세포/100 μ l/마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. A498 종양이 종양 크기 (mm³) = (폭 (mm) × 길이 (mm))²/2의 식에 따라 100 mm³의 평균 크기에 도달하면, 마우스를 분류 및 무작위화하고 (n=10), 처리를 시작하였다.

[0239] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 파조파넵 (보트리엔트®)을 매일 경구 위관을 통해 100 mg/kg으로 투약하였고, 비히클이 음성

대조군으로서의 역할을 하였다. FP-1039 및 파조파넵 투약을 동시에 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 2000 mm³를 초과했을 때 또는 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때 마우스를 안락사시켰다. 제89일 (종양 세포 접종 후)에, 파조파넵-처리 종양 군 (410 mm³의 평균 종양 부피)을 추가 처리 및 분석을 위해 2개의 개별적인 군으로 분리하였다. 1개의 군은 매일 파조파넵 처리 단독을 받는 것을 계속하였고, 제2 군은 1주일에 2번 FGFR1-ECD.339-Fc의 복막내 주사에 더하여 매일 파조파넵 처리를 받았다. 상기 방법에 따라 매주 2번 종양을 계속 측정하였다.

[0240] $P < 0.05$ 이면, FP-1039 및/또는 파조파넵으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 계산된 종양 부피의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P -값이 계산되었다.

[0241] 도 3은 이러한 실험의 제1 단계의 결과를 나타낸다. A498 이종이식편 모델 (낮은 FGF2, 높은 VEGF; FGF2/VEGF=1.01; 표 2 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 대한 반응을 거의 나타내지 않았다. 도 3A를 참조한다. 대조적으로, A498 이종이식편 모델은 단일 요법으로서의 파조파넵에 반응하였다. 도 3A-C를 참조한다. 놀랍게도, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵의 조합이 파조파넵 단독보다 더 큰 효능을 나타냈다 (제53일의 $p=0.0045$ 및 제81일의 $p=0.0012$). 상기문헌을 참조한다. 이러한 분석은 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 낮은 FGF2 및 높은 VEGF (비 = 1.01, 표 2 참조)의 A498 이종이식편 모델에서 종양 성장을 억제하지 않았지만, 파조파넵은 이러한 모델에서 효과적이었음을 실연하였다. 그러나, 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc는 파조파넵 단독보다 A498 이종이식편 모델에서 종양 성장의 더 큰 억제를 나타냈다.

[0242] 도 14는 이러한 실험의 제2 단계의 결과를 나타낸다. 다시 동물의 군을 분류한 날 (제89일)에 대해 상대적인 종양 부피 백분율을 그래프화함으로써 종양 크기의 변화가 제시된다. 도 14A를 참조한다. % 종양 크기 = $100 \times (\text{부피 (mm}^3\text{)}) / \text{제89일의 부피 (mm}^3\text{)}$ 의 식을 사용하여 각각의 개별적인 동물에 대해 종양 부피 백분율을 계산하였다. $P < 0.05$ 이면, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및/또는 파조파넵으로의 처리의 결과로서의 종양 크기 백분율의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 종양이 측정된 최종일 (제110일)의 계산된 종양 크기 백분율의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P -값이 계산되었다. 도 14B에 나타난 바와 같이, 마우스의 종양이 파조파넵 처리에 대해 저항성이 된 마우스에 파조파넵 + FGFR1-ECD.339-Fc를 투여하는 것이 계속된 파조파넵 처리 단독에 비교하여 종양 크기의 유의한 감소를 초래하였다.

[0243] **실시예 5: Caki-2 이종이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc 및 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**

[0244] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 투명 세포 신장 암종 (RCC) 세포주 Caki-2를 ATCC (버지니아주 머내서스; 카탈로그 번호 HTB-47)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이 식용으로 확장시켰다. Caki-2를 10% 열-불활성화 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액이 보충된 변형 맥코이 5a 배지(McCoy's 5a Medium Modified)에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37°C에서 성장시켰다.

[0245] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 5×10^7 개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 5×10^6 개의 세포/100 μ l/마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. Caki-2 종양의 경우, 종양이 종양 크기 (mm) = (폭 (mm) \times 길이 (mm))²/2의 식에 따라 200 mm³의 평균 크기에 도달하면 처리를 개시하였고, 마우스를 분류 및 무작위화하고 (n=10), 처리를 시작하였다.

[0246] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 파조파넵 (보트리엔트®)을 매일 경구 위관을 통해 100 mg/kg으로 투약하였고, 비히클이 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. FP-1039 및 파조파넵 투약을 동시에 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 2000 mm³를 초과했을 때 또는 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0247] $P < 0.05$ 이면, FP-1039 및/또는 파조파넵으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 계산된 종양 부피의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P -값이 계산되었다.

[0248] 도 4는 이러한 실험의 결과를 나타낸다. Caki-2 이중이식편 모델 (낮은 FGF2, 높은 VEGF; FGF2/VEGF=0.96; 표 2 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 대한 반응을 거의 나타내지 않았다. 도 4A를 참조한다. 대조적으로, Caki-2 이중이식편 모델은 단일 요법으로서의 파조파넵에 대해 강한 반응을 나타냈다. 도 4A 및 4B를 참조한다. 이러한 실험에서, FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039") 및 파조파넵의 조합이 단일 요법으로서의 파조파넵만큼 효과적이었다. 상기문헌을 참조한다. 이러한 분석은 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 낮은 FGF2 및 높은 VEGF (비 = 0.96, 표 2 참조)의 Caki-2 이중이식편 모델에서 종양 성장을 억제하지 않았지만, 파조파넵은 이러한 모델에서 효과적이었음을 실연하였다. 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc는 파조파넵 단독과 유사한 억제를 나타냈고, 이는 파조파넵에 대한 이러한 모델의 특정한 민감성의 반영일 수 있다. 약물 평가 및 연구 센터(Center for Drug Evaluation and Research)에 2008년 12월 19일에 제출된 파조파넵에 대한 문헌 [Pharmacology/Toxicology Review and Evaluation for New Drug Application (NDA) No. 22-465]에 따르면, CB-17 SCID 마우스에서의 Caki-2 종양 이중이식편은 10, 30, 및 100 mg/kg 파조파넵에 대해 각각 90%, 77%, 및 99%의 종양 억제를 나타낸다.

[0249] **실시예 6: SK-Hep-1 이중이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc 및 파조파넵과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**

[0250] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 간세포 암종 (HCC) 세포주 SK-Hep-1을 ATCC (카탈로그 번호 HTB-52)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. SK-Hep-1 세포를 10% 열-불활성화 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액이 보충된 이글 최소 필수 배지 (EMEM)에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37°C에서 성장시켰다.

[0251] 배양된 세포가 85-90% 전면 성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 5×10^7 개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 5×10^6 개의 세포/100 μ l/마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. SK-Hep-1 종양이 종양 크기 (mm) = (폭 (mm) × 길이 (mm))²/2의 식에 따라 100 mm³의 평균 크기에 도달하면, 마우스를 분류 및 무작위화하고 (n=10), 처리를 시작하였다.

[0252] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 파조파넵 (보트리엔트®)을 매일 경구 위관을 통해 100 mg/kg으로 투약하였고, 비히클이 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. 종양이 100 mm³였을 때 FP-1039 처리를 시작하였고, 이어서, 종양이 약 550 mm³에 도달했을 때 FP-1039로 처리된 종양 군의 절반에서 파조파넵 공동-처리를 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 2000 mm³를 초과했을 때 또는 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0253] $P < 0.05$ 이면, FP-1039 및/또는 파조파넵으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 계산된 종양 부피의 비대응(unpaired), 양측(two-tailed) t-테스트 분석을 사용하여 P -값이 계산되었다.

[0254] 도 5는 이러한 실험의 결과를 나타낸다. SK-Hep-1 이중이식편 모델 (높은 FGF2, 낮은 VEGF; FGF2/VEGF=1.34; 표 3 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 반응하였다 (p=0.0076). 도 5A 및 5B를 참조한다. 파조파넵의 추가는 이러한 실험에서 종양 성장 억제를 유의하게 증가시키지 않았다. 도 5C를 참조한다. 이러한 분석은 높은 FGF2 및 낮은 VEGF (비 = 1.34, 표 3 참조)의 SK-Hep-1 이중이식편 모델에서 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 종양 성장을 억제하였음을 실연하였다.

[0255] **실시예 7: HepG2, Huh7, 및 Hep3B 이중이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**

[0256] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 간세포 암종 (HCC) 세포주 HepG2 및 Hep3B를 ATCC (버지니아주 머내서스)로부터 구입하였고, Huh7을 JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. HepG2 및 Hep3B 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민, 및 페니실린-스트렙토마이신 항생제 용액이 보충된 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM)에서 배양하였다. Huh7 세포를 10% 소 태아 혈청

(FBS) 및 페니실린-스트렙토마이신 항생제 용액이 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM)에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37℃에서 성장시켰다.

[0257] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. HepG2 및 Hep3B는 5×10⁶개의 세포/100 μl/마우스로, Huh7은 1×10⁶개의 세포/100 μl/마우스로 세포를 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다.

[0258] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. Huh7 이종이식편의 경우, 비히클이 음성 대조군으로서 사용되었다. HepG2 및 Hep3B의 경우, 종양 세포 접종 1일 후에 투약을 시작하였다. Huh7 종양을 90 mm³ +/- 20 mm³에 도달하게 하였고, 이러한 시점에 이를 군으로 계층화하고, 투약을 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 종양 크기 (mm³) = (폭 (mm) × 길이 (mm))²/2의 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 HepG2의 경우 500 mm³, Hep3B의 경우 600 mm³, 또는 Huh7의 경우 2000 mm³를 초과했을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0259] P < 0.05이면, FP-1039로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 계산된 종양 부피의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P-값이 계산되었다.

[0260] 도 6은 이러한 실험의 결과를 나타낸다. 각각 FGF2/VEGF 비가 < 1인 HepG2 세포, Hep3B 세포, 또는 Huh7 세포에서 FP-1039를 사용한 단일 작용제 효능이 관찰되지 않았다. 표 3을 참조한다.

[0261] **실시예 8: SK-Hep-1 이종이식편 모델에서의 단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc 및 소라페닙과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**

[0262] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 간세포 암종 (HCC) 세포주 SK-Hep-1을 ATCC (카탈로그 번호 HTB-52)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. SK-Hep-1 세포를 10% 열-불활성화 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액이 보충된 이글 최소 필수 배지 (EMEM)에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37℃에서 성장시켰다.

[0263] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 5×10⁷개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 5×10⁶개의 세포/100 μl/마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. SK-Hep-1 종양이 종양 크기 (mm³) = (폭 (mm) × 길이 (mm))²/2의 식에 따라 100 mm³의 평균 크기에 도달하면, 마우스를 분류 및 무작위화하고 (n=10), 처리를 시작하였다.

[0264] FGFR1-ECD.339-Fc (FP-1039) 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 (IP) 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 소라페닙 (넥사바르(Nexavar)®)을 일주일에 5번 매일 경구 위관을 통해 20 mg/kg으로 투약하였다. 소라페닙 처리에 대한 대조군으로서, 동물에게 비히클 (1% DMSO / 19% 1:1 크레모포르/에탄올 / 80% 물)을 매일 위관을 통해 투약하였다. 종양이 100 mm³였을 때 FP-1039 처리를 시작하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 1000 mm³를 초과했을 때, 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때, 또는 동물 건강이 손상되었을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0265] P < 0.05이면, FP-1039 및/또는 소라페닙으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 종양이 측정된 최종일의 계산된 종양 부피의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P-값이 계산되었다.

[0266] 도 7은 이러한 실험의 결과를 나타낸다. SK-Hep-1 이종이식편 모델 (높은 FGF2, 낮은 VEGF; FGF2/VEGF=1.34; 표 3 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 반응하였고 (제61일의 p=0.0036), 단일 작용제 요법으로서의 소라페닙에 또한 반응하였다 (제61일의 p<0.0001). 도 7A, B, 및 C를 참조한다. FGFR1-ECD.339-Fc 및 소라페닙의 조합은 소라페닙 단독에 비해 (제61일의 p=0.0004) 또는 FGFR1-ECD.339-Fc 단독에 비해 (p=0.001) 종양 성장 억제를 유의하게 증가시켰다. 상기문헌을 참조한다. 이러한 분석은 높은 FGF2 및

낮은 VEGF의 SK-Hep-1 이종이식편 모델에서 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 종양 성장을 억제하였고, FGFR1-ECD.339-Fc 및 소라페닙의 조합이 부가적인 효과가 있어서, 소라페닙 또는 FGFR1-ECD.339-Fc 단독에 비해 종양 성장 억제를 유의하게 증가시켰다는 것을 실연하였다.

[0267]

단일 작용제로서의 FGFR1-ECD.339-Fc, 및 소라페닙과 조합된 FGFR1-ECD.339-Fc를 HepG2 이종이식편 모델에서 또한 테스트하였다. HepG2 세포는 FGF2/VEGF 비가 0.54로 낮고, FGFR1-ECD.339-Fc는 단일 작용제로서 효과적이지 않았다. 실시예 7을 참조한다. 단일 작용제로서의 소라페닙이 HepG2 이종이식편 모델에서 종양 성장을 억제하는 한편, FGFR1-ECD.339-Fc 및 소라페닙의 조합은 소라페닙 단독보다 더욱 효과적인 것으로 확인되지 않았다.

[0268]

실시예 9: FGFR1-ECD.339-Fc 반응의 예측인자

[0269]

FGF 리간드, FGF 수용체, FGF 결합 단백질, FGF 신호전달 분자를 포함하는 유전자들의 패널, 및 일군의 혈관형성-관련 표적의 RNA 발현을 35개의 종양 세포주 및 이종이식편의 세트에서 qRT-PCR을 사용하여 결정하였다. 시험관 내에서 성장된 세포주 또는 생체 내에서 성장된 종양 이종이식편으로부터 RNAeasy® 미니 키트 (퀴아젠 (Qiagen), 독일)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 DNase I로 처리한 후, 퀀티텍트 역전사 키트 (QuantiTect Reverse Transcription Kit) (퀴아젠, 독일)를 사용하여 무작위 6량체 프라이밍(priming) 및 역전사효소로 cDNA를 생성시켰다. 인간 및 마우스 RNA 발현을 인간 GUSB 대조군 기준 퀀티텍트 프라이머 검정법 (QuantiTect Primer Assay) (퀴아젠, 독일)을 이용하여 퀀티텍트 프라이머 검정법 (퀴아젠, 독일)을 사용하여 결정하였다. 퀀티텍트 SYBR 녹색 PCR 키트(QuantiTect SYBR Green PCR Kit) (퀴아젠, 독일)가 실시간 qRT-PCR 및 ABI 프리즘 ViiA™ 7 실시간 PCR 시스템(ABI Prism ViiA™ 7 Real-Time PCR System) (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터시티)를 사용하여 mRNA 발현 수준을 정량하는데 사용되었다. 상대적인 유전자 발현 정량을 기준물로서의 인간 GUSB 및 시판되는 RNA 대조군 (스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라호야)을 사용하여 비교 Ct 방법에 따라 계산하였다. 하기 식에 따라 상대적 정량을 결정하였다:

$$2^{-(\Delta Ct \text{ 샘플} - \Delta Ct \text{ 검정물})}$$

[0270]

이러한 실험에서 사용된 종양 세포주 및 이종이식편이 표 4에서 제시된다. 마우스 이종이식편 모델에서의 FGFR1-ECD.339-Fc에 대한 투약 일정, 종양 성장 억제 백분율 (TGI (%)) 및 종양 성장 억제의 통계적 유의성 (P 값), 뿐만 아니라 세포주에서의 *FGFR1* 유전자의 증폭 여부가 표 4에서 또한 제시된다.

[0271]

[표 4]

[0272]

이종이식편 모델들의 패널에서의 FGFR1-ECD.339-Fc의 항종양 활성

종양 유형	이종이식편 모델	세포주 / PDX	투약 경로	용량	투약 일정	TGI (%)	P 값	<i>FGFR1</i> 증폭 상태
결장	HCT116	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	Colo205	세포주	IV	5 mg/kg	BIW	38%	$P < 0.001$	증폭되지 않음
	Colo201	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
신장	G-401	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	36%	$P < 0.05$	증폭되지 않음
	A498	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	7%	ns	증폭되지 않음
	Caki-1	세포주	IV	10 mg/kg	BIW	81%	$P < 0.001$	증폭되지 않음
폐	A549	세포주	IP	10 mg/kg	BIW	38%	$P < 0.05$	증폭되지 않음

[0273]

	NCI-H460	세포주	IP	10 mg/kg	BIW	35%	$P < 0.05$	증폭되지 않음
	NCI-H226	세포주	IP	15 mg/kg	3x/w	55%	$P < 0.001$	증폭되지 않음
	NCI-H520	세포주	IP	20 mg/kg	BIW	47%	$P < 0.05$	증폭됨
	NCI-H1703	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	31%	$P < 0.05$	증폭됨
	NCI-H2126	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	NCI-H441	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	NCI-H358	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	NCI-H522	세포주	IP	10 mg/kg	BIW	42%	$P < 0.05$	증폭되지 않음
	NCI-H1581	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	74%	$P = 0.002$	증폭됨
	DMS53	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	64%	0.003	증폭됨
	DMS114	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	64%	$P < 0.001$	증폭됨
	Calu-1	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	D35087	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	57%	$P < 0.01$	증폭되지 않음
	D37638	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	D35376	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	LXFA-737	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	LXFA-629	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	65%	$P = 0.007$	증폭되지 않음
중피종	MSTO-211H	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	64%	$P < 0.0001$	증폭되지 않음
교모세포종	U-87	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	U-118	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	36%	ns	증폭되지 않음
	U-251	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	48%	$P = 0.0078$	증폭되지 않음
망막모세포종	Y79	세포주	IP	10 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
전립선	Du145	세포주	IP	0.15 mg/kg	3x/w	31%	ns	증폭되지 않음
자궁내막	MFE-280	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	96%	$P < 0.001$	증폭되지 않음
	HEC-1B	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	30%	$P < 0.05$	증폭되지 않음
	MFE-319	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
유방	MDA-MB-231	세포주	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	증폭되지 않음
	JIMT1	세포주	IP	1 mg/kg	BIW	28%	$P < 0.05$	증폭되지 않음

예시적인 이종이식편 실험은 하기와 같다. Caki-1 및 MSTO-211H의 경우, 5백만개의 세포를 SCID 마우스 (N = 10마리/군)의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. FGFR1-ECD.339-Fc 또는 알부민을 표 4에 지시된 용량으로 일 주일에 2번 복막내 투여하였다. 신세포 암종 (RCC) Caki-1 모델에서는, 6주 동안 1주일에 2번 10 mg/kg으로 FGFR1-ECD.339-Fc를 투여하는 것이 81% ($P < 0.001$) 종양 성장 억제 (TGI)를 초래하였다. MSTO-211H 중피종 모델에서는, FGFR1-ECD.339-Fc 투여가 종양 성장을 64% ($P < 0.0001$)만큼 감소시켰다. 반응 종양에서, 곡선하 면적 (AUC) 분석에 의해 평가했을 때 FGFR1-ECD.339-Fc가 종양 부피를 유의하게 감소시켰다. 25-96% 억제의 범위로, 검사된 모델의 19/35 (54%)에서 반응이 관찰되었다 (표 4 참조).

FGF 리간드, FGF 수용체, FGF 결합 단백질 및 FGF 신호전달 분자를 포함하는 유전자들의 패널의 RNA 발현을 표 4로부터의 특정 이종이식편 모델에서 qRT-PCR을 사용하여 검사하였다. 그 후, 유전자 발현을 FGFR1-ECD.339-Fc 반응에 상호관련시켜, 항종양 활성과 양성으로 및 음성으로 상호관련되는 RNA 발현 서명을 결정하였다.

도 8은 FGFR1-ECD.339-Fc 반응자 및 비-반응자 이종이식편에서의 (A) FGF2 mRNA (GUSB에 대해 정규화됨) 및 (B) FGF2 단백질 발현을 나타낸다. FGF2의 발현 ($P = 0.03569$)이 FGFR1-ECD.339-Fc 반응과 양성으로 연관되었

다. *FGF2*는 FGFR1-ECD.339-Fc 반응자와 비-반응자 이중이식편 사이에서 높은 비 (247.7배)의 mRNA 유전자 발현을 나타냈다. *FGF2* 단백질 수준이 또한 FGFR1-ECD.339-Fc 반응과 상호관련되는 것으로 증명되었다.

도 9는 FGFR1-ECD.339-Fc 반응자 및 비-반응자 이중이식편에서의 (A) VEGFA mRNA (GUSB에 대해 정규화됨) 및 (B) VEGFA 단백질 발현을 나타낸다. *VEGFA*의 발현 ($P = 0.042$)이 FGFR1-ECD.339-Fc 반응과 음성으로 연관되었다. VEGFA 단백질 수준이 또한 FGFR1-ECD.339-Fc 반응과 음성으로 상호관련되는 것으로 증명되었다 ($p=0.0303$).

실시예 10: 중피종 세포주에서의 FGF2 및 VEGF 수준

FGF2 및 VEGF mRNA 발현 수준 데이터를 문헌 [Cancer Cell Line Encyclopedia] (CCLE; www.broadinstitute.org/ccle/home)으로부터 입수하고, 12개의 중피종 세포주에 대해 컴파일링하였다. 아피메트릭스 U133+2 어레이를 사용하여 CCLE mRNA 데이터가 유래되었다. 로버스트 멀티-어레이 애버리지 (RMA)를 사용하여 각각의 프로브 세트에 대해 미처리 아피메트릭스 CEL 파일이 단일 값으로 전환되었으며, 분위수 정규화를 사용하여 정규화되었다. 예를 들어, 문헌 [Irizarry, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics 4, 249-264, (2003)]; [Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics 19, 185-193, (2003)]을 참조한다. 각각의 유전자에 대한 특이적 프로브 세트 ID는 하기와 같다: FGF2 (2247_at); VEGF (7422_at). CCLE에서, 중피종 세포주는 다른 암 세포주에 비교하여 가장 높은 수준 중 하나의 FGF2 mRNA가 있다. (데이터는 제시되지 않음) 추가로, 표 5에 나타난 바와 같이, 분석된 12개의 중피종 세포주 중 11개에서 FGF2 mRNA 수준이 VEGF 수준보다 더 높다.

[표 5]

중피종 세포주에 대한 CCLE로부터의 FGF2 및 VEGF 수준

중피종 세포주	FGF2 mRNA	VEGF mRNA
MSTO-211H	10.67467	7.594727
RS5	10.60627	9.440938
ISTMES1	10.30963	7.107872
MPP89	10.12146	7.619482
NCI-H226	9.905197	7.045242
NCI-H2052	9.808463	6.856421
NCI-H2452	9.446462	7.908656
JL1	9.411504	8.830768
ISTMES2	9.098945	7.419612
DM3	8.865603	7.968453
ACCMESO1	8.663109	7.583632
NCI-H28	8.01711	9.426254

실시예 11: 중피종 종양 이중이식편 모델에서의 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여

7주령 암컷 SCID 마우스 (타코닉(Taconic), 뉴욕주 허드슨)에 NCI-H226 세포 (ATCC, 버지니아주 머내서스)를 5×10^6 개의 세포/마우스로 피하 이식하고, 종양 크기가 ~176-277 mm³에 도달했을 때 종양-보유 마우스를 4개의 군으로 무작위화하였다 (n=8마리/군). 마우스를 3가지 상이한 농도 (1.024, 5.12 또는 25.6 mg/kg)의 FGFR1-ECD.339-Fc로 29일 동안 1주일에 3회 (t.i.w.) 처리하였다. 종양 크기 및 체중을 1주일에 2번 측정하였다.

도 10에 나타난 바와 같이, 1.024 mg/kg (16.2% TGI), 5.12 mg/kg (56.8% TGI) 및 25.6 mg/kg (77.8% TGI)의 FGFR1-ECD.339-Fc로 처리된 마우스에서 제29일에 종양 성장 억제 (TGI)가 관찰되었다.

- [0287] 5 내지 6주령 암컷 SCID 마우스에 MSTO-211H 세포 (ATCC, 버지니아주 머내서스)를 5×10^6 개의 세포/마우스로 피하 이식하고, 종양 크기가 $\sim 150\text{--}225 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때 종양-보유 마우스를 3개의 군으로 무작위화하였다 ($n=10$ 마리/군). 마우스를 2가지 상이한 농도 (5.12 또는 25.6 mg/kg)의 FGFR1-ECD.339-Fc로 29일 동안 1주일에 3회 (t.i.w.) 처리하였다. 종양 크기 및 체중을 1주일에 2번 측정하였다.
- [0288] 도 11에 나타난 바와 같이, 5.12 mg/kg (20.3% TGI) 및 25.6 mg/kg (50.1% TGI)의 FGFR1-ECD.339-Fc로 처리된 마우스에서 제29일에 종양 성장 억제 (TGI)가 관찰되었다.
- [0289] 래트 항-마우스 pan-내피 세포 항원 항체 (MECA-32; BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 뉴저지주 프랭클린 레이크스)를 사용하는 내피 세포 면역조직화학 (IHC) 염색을 NCI-H226 (중피종) 이종이식편 연구로부터의 종양에서 수행하였다. 종양-보유 마우스를 비히클 (0.9% 염수) 또는 증가되는 용량의 FGFR1-ECD.339-Fc (1.024, 5.12, 또는 25.6 mg/kg)로 29일 동안 1주일에 3회 (t.i.w.) 처리하였다. 제30일에 종양을 수확하였다. 혈관 개수/조직 면적을 측정함으로써 MECA-32 IHC 염색의 정량을 분석하였다.
- [0290] 도 12에 제시된 바와 같이, 외부 영역 데이터 (A) 및 외부 + 내부 영역 데이터 세트 (전체 종양 질량; C)를 사용하여 FGFR1-ECD.339-Fc 처리에 의한 혈관 밀도의 용량-의존적이고 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 이러한 실험에서, 내부 영역 데이터 세트 (B)로 유의한 차이가 실연되지 않았다.
- [0291] IHC에 의해 혈관 밀도를 측정하는 또 다른 비제한적인 예시적인 방법은 CD31/PECAM-1을 인식하는 항체를 사용한다.
- [0292] **실시예 12: HLF 종양 이종이식편 모델에서의 FGFR1-ECD.339-Fc의 투여**
- [0293] 6주령 암컷 CB17 SCID 마우스를 찰스 리버 래버러토리즈 (매사추세츠주 윌밍턴)로부터 구입하고, 연구를 시작하기 전에 1주일 동안 순응시켰다. 인간 간세포 암종 (HCC) 세포주 HLF를 JCRB (카탈로그 번호 JCRB0405)로부터 구입하였다. 세포를 3회의 계대 동안 완전 성장 배지에서 배양하여 이식용으로 확장시켰다. HLF 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제-항진균제 용액이 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM)에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂의 습식 대기에서 37°C에서 성장시켰다.
- [0294] 배양된 세포가 85-90% 전면성장에 도달했을 때, 세포를 수확하고, 50% 매트릭셀을 함유하는 저온 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 프리 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 2.5×10^7 개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 2.5×10^6 개의 세포/100 μl /마우스로 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 세포 이식 후 종양 성장에 대해 마우스를 1주일에 2번 모니터링하였다. HLF 종양이 종양 크기 (mm^3) = (폭 (mm) \times 길이 (mm))²/2의 식에 따라 100 mm^3 의 평균 크기에 도달하면, 마우스를 분류하여 4개의 처리군 중 하나로 무작위화하고, 투약을 시작하였다. 약 2개월 내에 1차 종양이 이러한 부피에 도달하였다. 약 100 mm^3 의 부피에 도달했을 때 종양-보유 마우스가 계속 생체내 연구에 추가되었다 ($n=8\text{--}10$ 마리/군).
- [0295] FGFR1-ECD.339-Fc 또는 음성 대조군으로서의 알부민을 15 mg/kg으로 복막내 (IP) 주사를 통해 1주일에 2번 투약하였다. 소라페닙 (넥사바르®)을 일주일에 5번 매일 경구 위관을 통해 20 mg/kg으로 투약하였다. 소라페닙 처리에 대한 대조군으로서, 동물에게 비히클 (1% DMSO / 19% 1:1 크레모포르/에탄올 / 80% 물)을 매일 위관을 통해 투약하였다. 요법을 시작했을 때, 각각의 마우스에서 매주 2회 종양 크기를 측정하였다. 각각의 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 상기 식에 따라 종양 크기를 계산하였다. 피하 종양 부피가 1500 mm^3 을 초과했을 때, 종양이 과도하게 괴사성이 되었을 때, 또는 동물 건강이 손상되었을 때 마우스를 안락사시켰다.
- [0296] $P < 0.05$ 이면, FGFR1-ECD.339-Fc 및/또는 소라페닙으로의 처리의 결과로서의 종양 부피의 비교가 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다. 처리 시작 후 제24일의 계산된 종양 부피의 비대응, 양측 t-테스트 분석을 사용하여 P -값이 계산되었다.
- [0297] 도 13은 이러한 실험의 결과를 나타낸다. HLF 이종이식편 모델 (높은 FGF2, 낮은 VEGF; FGF2/VEGF=1.23; 표 3 참조)은 단일 요법으로서의 FGFR1-ECD.339-Fc ("FP-1039")에 반응하였고 (제24일의 $p=0.0175$), 단일 작용제 요법으로서의 소라페닙에 또한 반응하였다 (제24일의 $p=0.0020$). 도 13A 및 B를 참조한다. FGFR1-ECD.339-Fc 및 소라페닙의 조합은 소라페닙 단독에 비해 ($p=0.0289$) 또는 FGFR1-ECD.339-Fc 단독에 비해 ($p=0.0026$) 종양 성장 억제를 유의하게 증가시켰다. 상기문헌을 참조한다. 이러한 분석은 높은 FGF2 및 낮은 VEGF의 HLF 이종이식편 모델에서 FGFR1-ECD.339-Fc 단독이 종양 성장을 억제하였고, FGFR1-ECD.339-Fc 및 소라페닙의 조합이

소라페닙 또는 FGFR1-ECD.339-Fc 단독에 비해 유의하게 종양 성장 억제를 증가시켰다는 것을 실연하였다.

서열 표

하기 표는 본원에서 논의된 특정 서열들을 열거한다. 달리 지시되지 않는 한, 신호 펩티드 없이 FGFR1 서열이 제시된다.

서열 및 설명

서열 번호	설명	서열
1	전장 인간 FGFR1 ECD (신호 펩티드 있음); SP-hFGFR1- ECD.353	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EERPAVMTSP LYLE
2	전장 인간 FGFR1 ECD (신호 펩티드 없음); hFGFR1- ECD.353	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EERPAVMTSP LYLE
3	SP-hFGFR1-ECD.339	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL
4	hFGFR1-ECD.339	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL
5	SP-hFGFR1-ECD.339-Fc	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EPKSSDKTHT CPPECAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHDEPEVKF GWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS

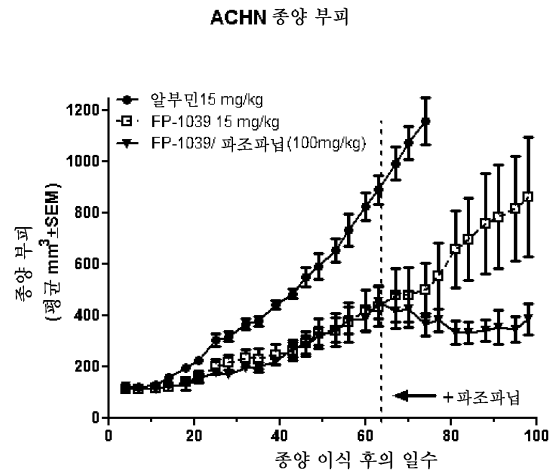
		RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
6	hFGFR1-ECD.339-Fc	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSPPSGSD TTYFSVNVSD ALPSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNFVA PYWTSPEKME KKLHAVPAK TVKFKCPSSG TPNPILRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIIP DNLPYVQILK TAGVNTTDE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
7	hFGFR1 신호 펩티드	MWSWKCLLFWAVLVTATLCTA
8	Fc C237S	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
9	예시적인 Fc #1	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLEPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
10	예시적인 Fc #2	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

[0302]

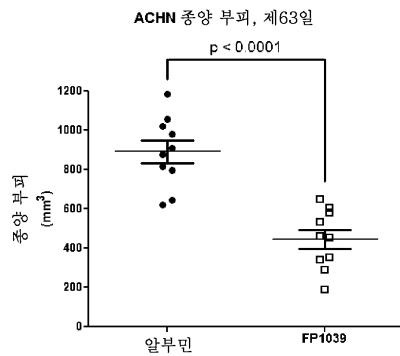
도면

도면1

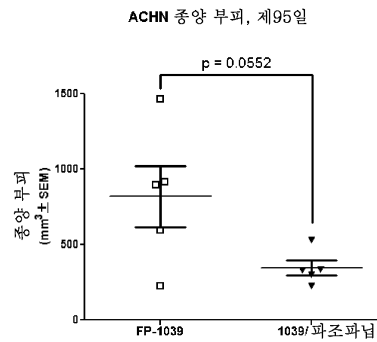
A



B

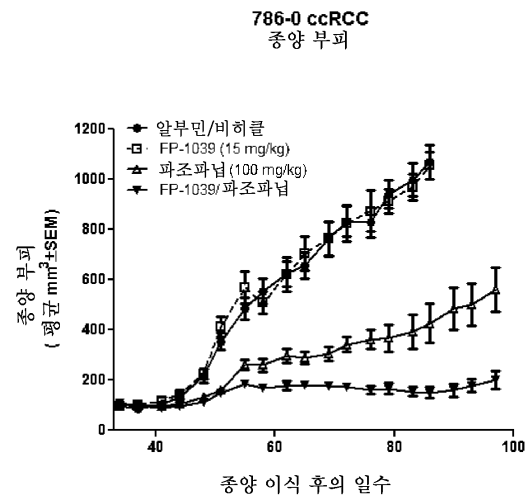


C

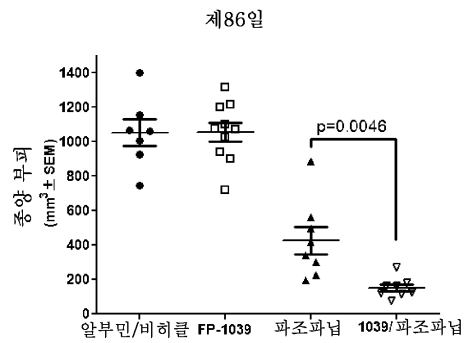


도면2

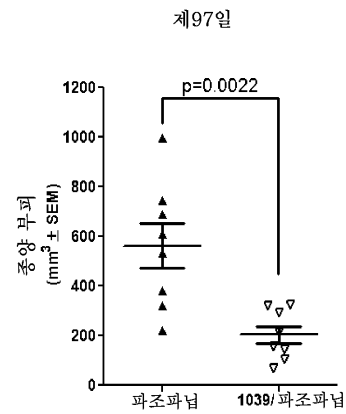
A



B

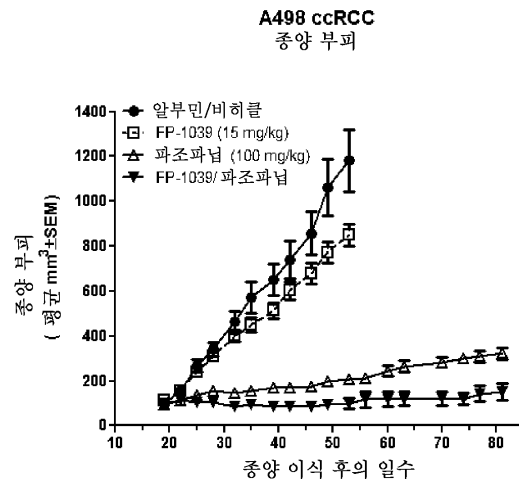


C

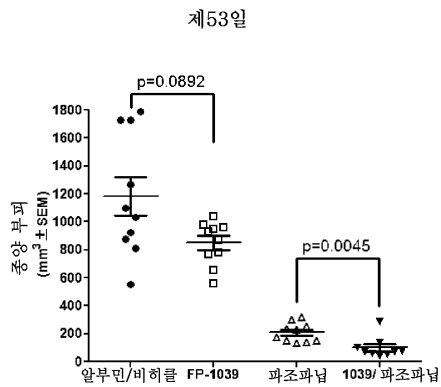


도면3

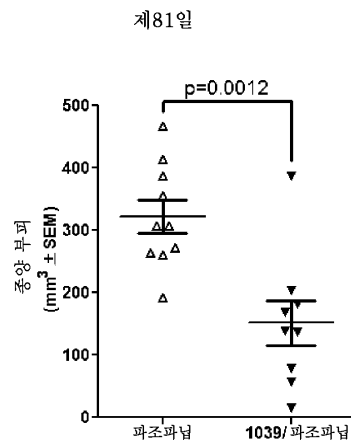
A



B

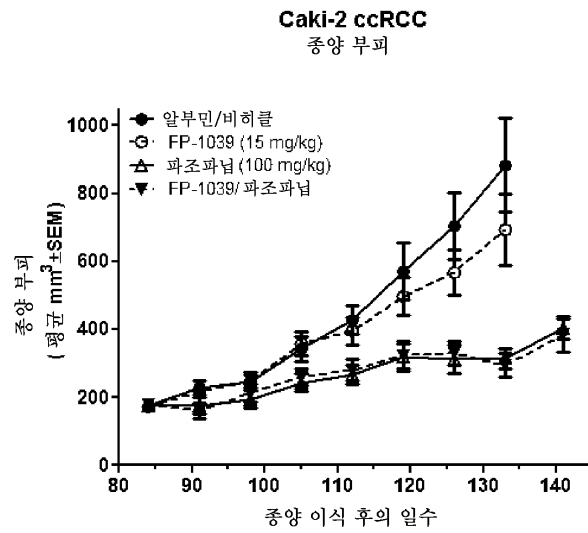


C

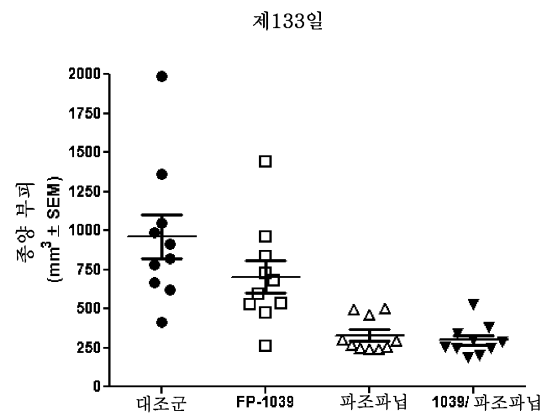


도면4

A

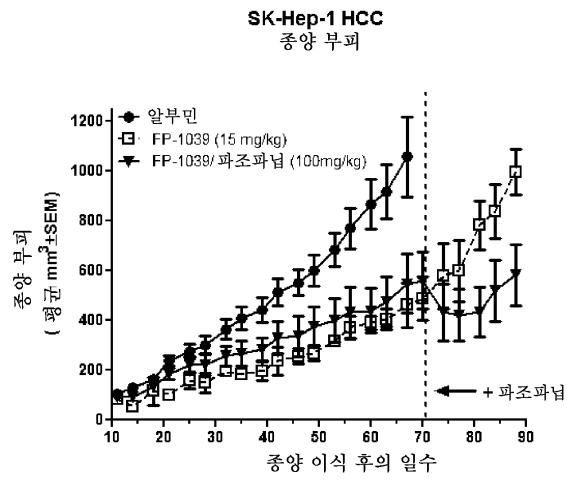


B

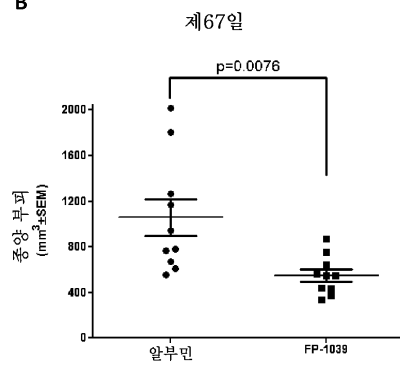


도면5

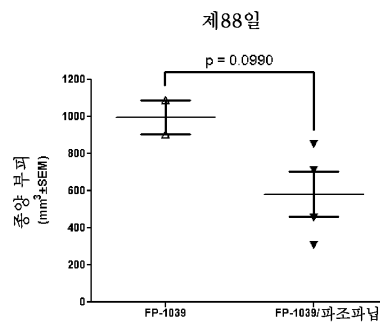
A



B

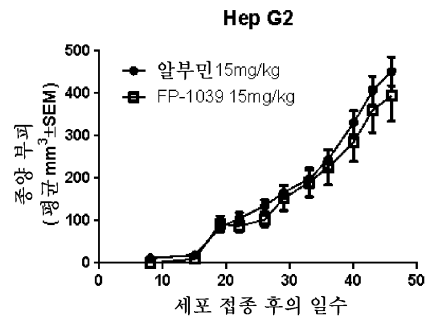


C

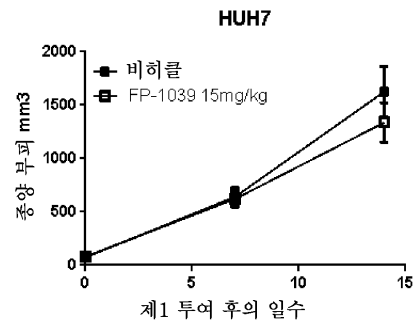


도면6

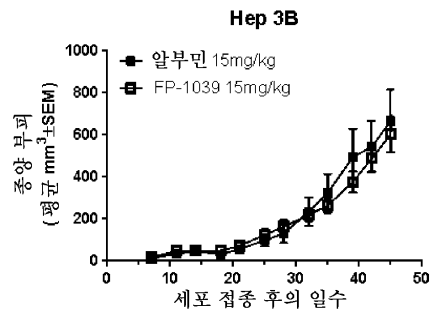
A



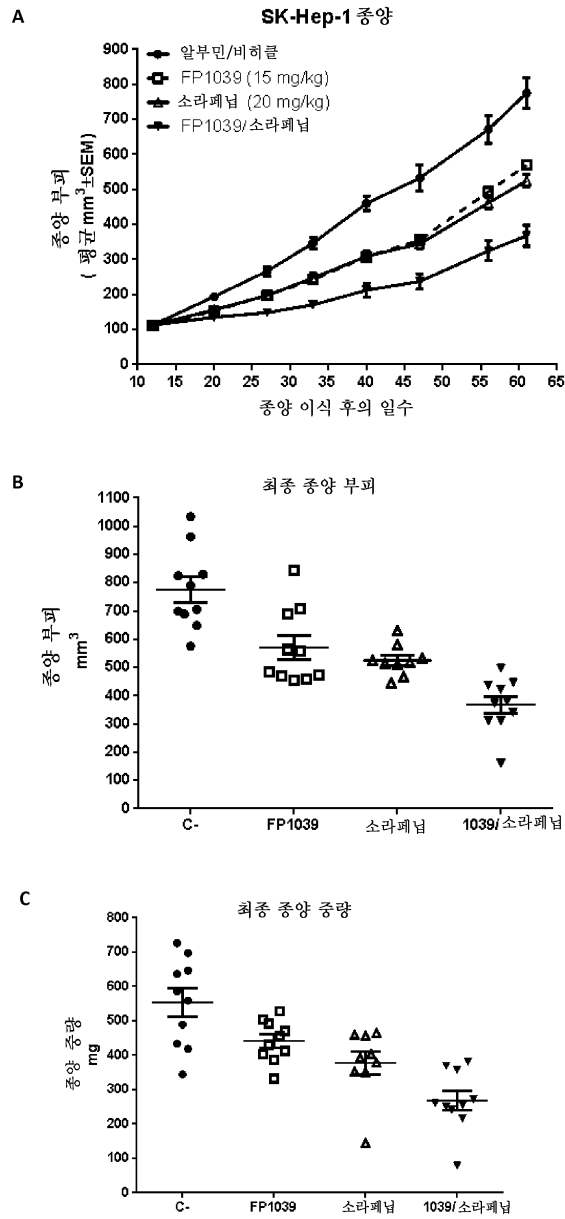
B



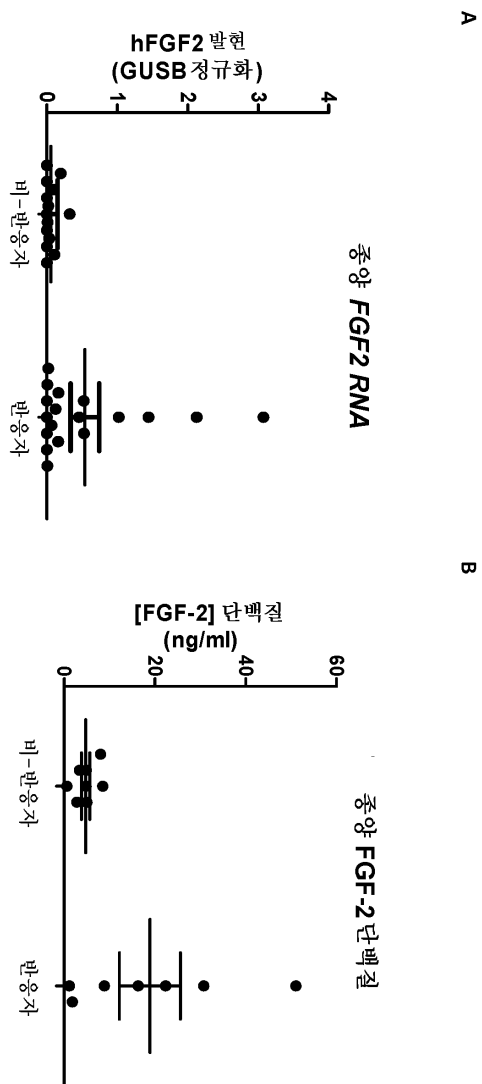
C



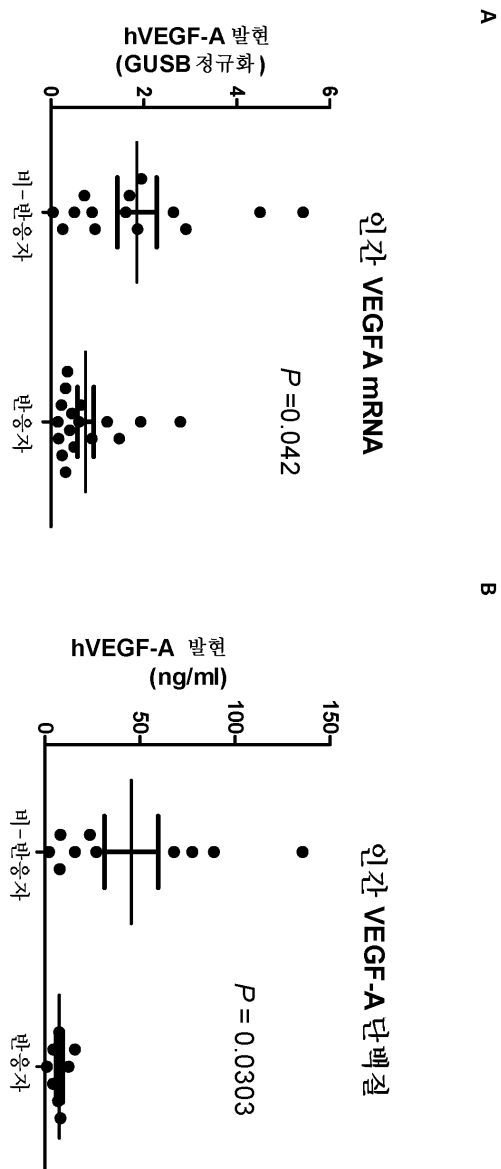
도면7



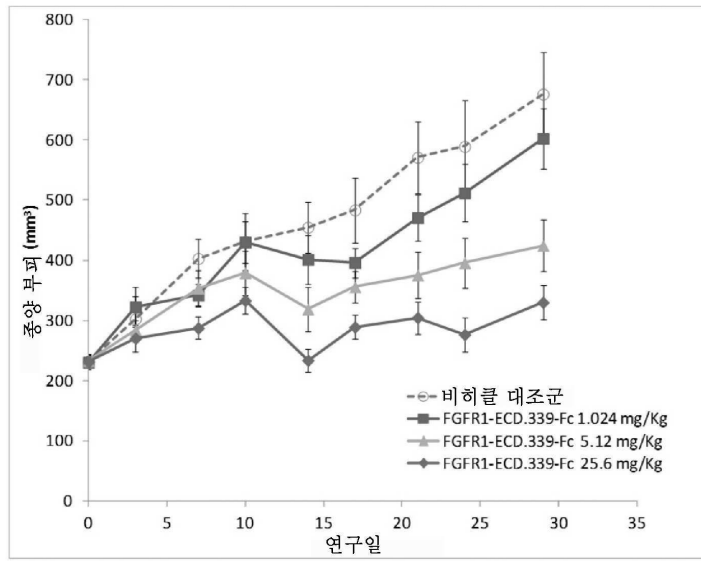
도면8



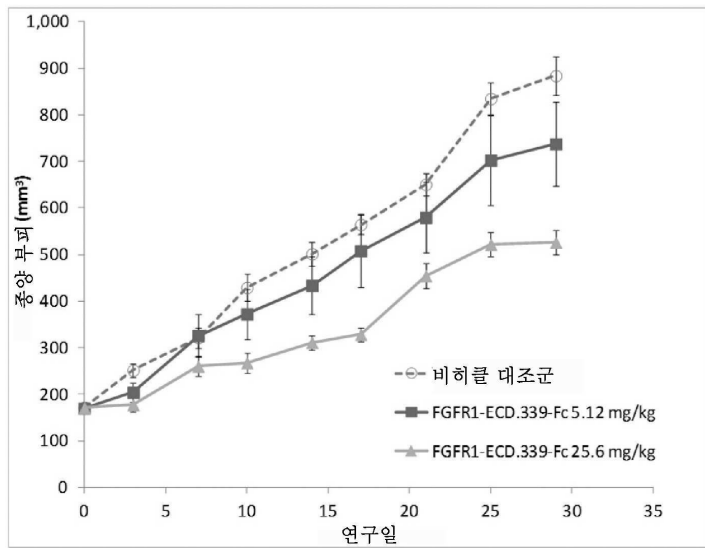
도면9



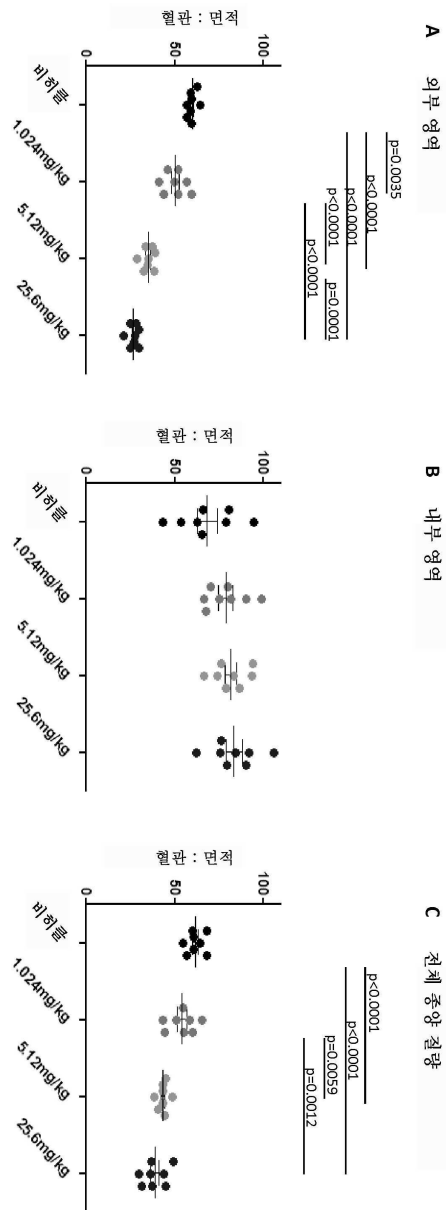
도면10



도면11

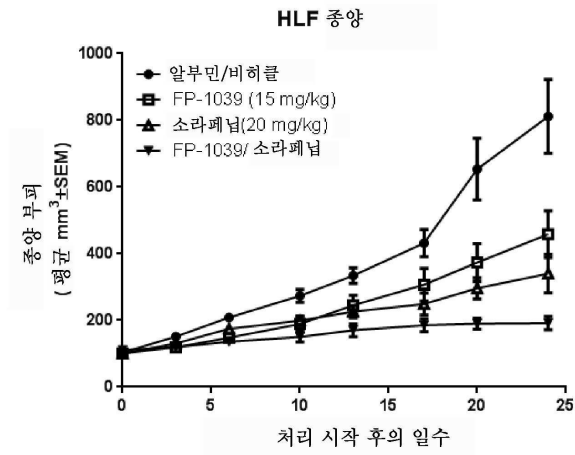


도면12

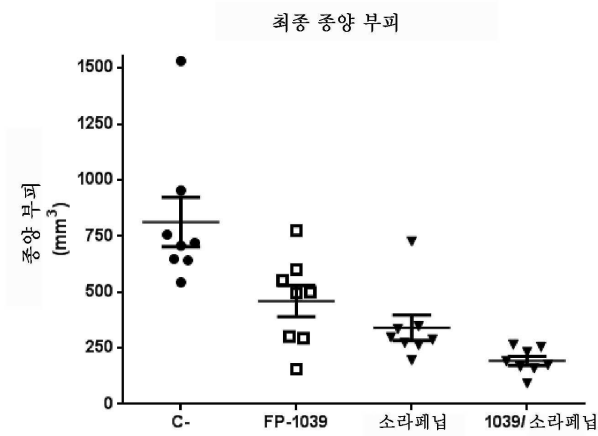


도면13

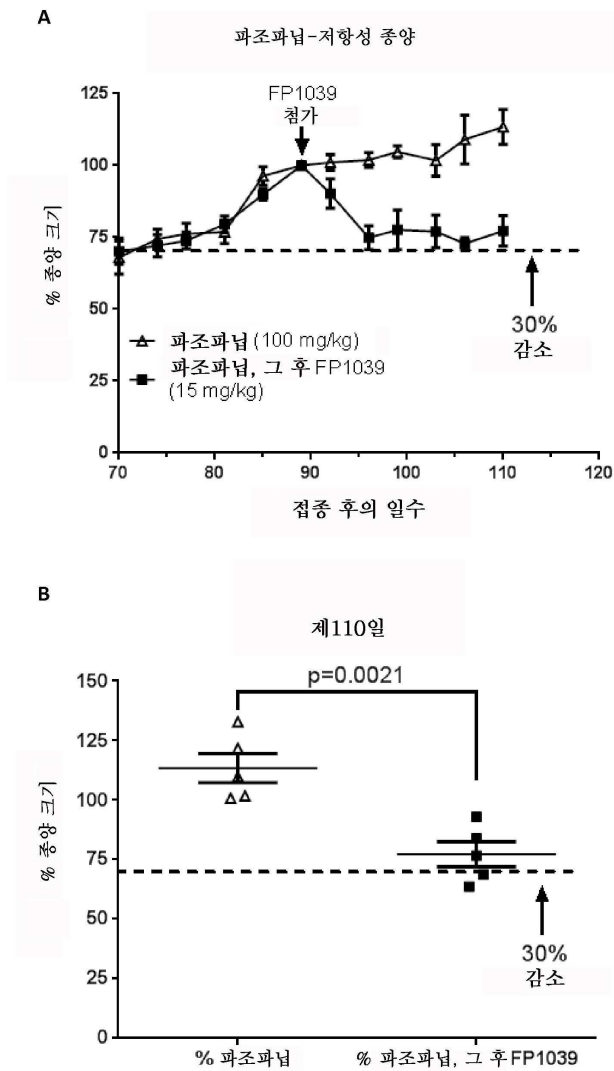
A



B



도면14



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.

<120> METHODS OF TREATING CANCER

<130> FPT-33345/WO-1/ORD

<150> US 61/826,975

<151> 2013-05-23

<150> US 61/936,647

<151> 2014-02-06

<150> US 61/974,279

<151> 2014-04-02

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly

35 40 45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile

50 55 60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr

100 105 110

Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp

115 120 125

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr

130 135 140

Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly

180 185 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
195 200 205

Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
245 250 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu
260 265 270

Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
275 280 285

Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro
290 295 300

Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305 310 315 320

Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu
325 330 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
340 345 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr
355 360 365

Ser Pro Leu Tyr Leu Glu
370

<210> 2

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp Gly Ala Pro

1					5					10					15				
Val	Glu	Val	Glu	Ser	Phe	Leu	Val	His	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Gln	Leu				
				20						25						30			
Arg	Cys	Arg	Leu	Arg	Asp	Asp	Val	Gln	Ser	Ile	Asn	Trp	Leu	Arg	Asp				
				35						40						45			
Gly	Val	Gln	Leu	Ala	Glu	Ser	Asn	Arg	Thr	Arg	Ile	Thr	Gly	Glu	Glu				
				50						55						60			
Val	Glu	Val	Gln	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys				
65				70				75				80							
Val	Thr	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ser	Val	Asn				
				85						90						95			
Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp				
				100						105						110			
Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys	Glu	Thr	Asp	Asn	Thr	Lys	Pro	Asn	Pro	Val				
				115						120						125			
Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Ser	Pro	Glu	Lys	Met	Glu	Lys	Lys	Leu	His	Ala				
130				135				140											
Val	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Lys	Phe	Lys	Cys	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr				
145				150				155				160							
Pro	Asn	Pro	Thr	Leu	Arg	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Pro				
				165						170						175			
Asp	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ser	Ile				
				180						185						190			
Ile	Met	Asp	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Ile				
195				200				205											
Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn	His	Thr	Tyr	Gln	Leu	Asp	Val				
210				215				220											
Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala				
225				230				235				240							
Asn	Lys	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	Phe	Met	Cys	Lys	Val				
				245						250						255			

Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val
260 265 270

Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu
275 280 285

Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His
290 295 300

Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
305 310 315 320

Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu
325 330 335

Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr Ser Pro Leu Tyr Leu
340 345 350

Glu

<210> 3

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
20 25 30

Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
35 40 45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
50 55 60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
65 70 75 80

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

85	90	95
Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr		
100	105	110
Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp		
115	120	125
Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr		
130	135	140
Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu		
145	150	155
Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys		
165	170	175
Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly		
180	185	190
Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr		
195	200	205
Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly		
210	215	220
Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr		
225	230	235
Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln		
245	250	255
Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu		
260	265	270
Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu		
275	280	285
Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro		
290	295	300
Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu		
305	310	315
Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu		
325	330	335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
 340 345 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu
 355 360

<210> 4

<211> 339

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

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

Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg Ile Thr Gly Glu Glu
 50 55 60
 Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys
 65 70 75 80
 Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn
 85 90 95
 Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 100 105 110

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

165 170 175
 Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile
 180 185 190
 Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile
 195 200 205
 Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val
 210 215 220
 Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
 225 230 235 240

 Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val
 245 250 255
 Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val
 260 265 270
 Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu
 275 280 285
 Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His
 290 295 300

 Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 Glu Ala Leu

<210> 5

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
 1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
 20 25 30
 Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
 35 40 45
 Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
 50 55 60
 Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
 65 70 75 80

 Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
 85 90 95
 Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
 115 120 125
 Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
 130 135 140

 Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
 145 150 155 160
 Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
 165 170 175
 Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
 180 185 190
 Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
 195 200 205

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

260	265	270
Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu		
275	280	285
Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro		
290	295	300
Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu		
305	310	315
Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu		
325	330	335
Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala		
340	345	350
Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr		
355	360	365
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
370	375	380
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
385	390	395
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
405	410	415
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
420	425	430
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
435	440	445
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
450	455	460
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
465	470	475
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
485	490	495
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
500	505	510

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
515 520 525

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
530 535 540

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
545 550 555 560

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
565 570 575

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585 590

<210> 6

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp Gly Ala Pro
1 5 10 15

Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly Asp Leu Leu Gln Leu
20 25 30

Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile Asn Trp Leu Arg Asp
35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn
85 90 95

Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp
100 105 110

Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val

115	120	125	
Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala			
130	135	140	
Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr			
145	150	155	160
Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro			
165	170	175	
Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile			
180	185	190	
Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile			
195	200	205	
Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val			
210	215	220	
Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala			
225	230	235	240
Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val			
245	250	255	
Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val			
260	265	270	
Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu			
275	280	285	
Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His			
290	295	300	
Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala			
305	310	315	320
Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu			
325	330	335	
Glu Ala Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
340	345	350	
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
355	360	365	

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

370 375 380
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
385 390 395 400
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
405 410 415
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
420 425 430
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

435 440 445
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
450 455 460
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
465 470 475 480
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
485 490 495
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

500 505 510
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
515 520 525
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
530 535 540
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
545 550 555 560
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala

1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala

20

<210> 8

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20

25

30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35

40

45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50

55

60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65

70

75

80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85

90

95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100

105

110

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

115

120

125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130

135

140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145

150

155

160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

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

210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 9

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

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

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

100 105 110
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

130 135 140
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

 165 170 175
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220
 Ser Pro Gly Lys
 225
 <210> 10

 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 10
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

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

100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225