

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 janvier 2010 (14.01.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/004204 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)

Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **REMY, Elisabeth** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/051343

(74) Mandataire : **MARTIN-TOUAUX, Elsa**; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :
7 juillet 2009 (07.07.2009)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08/03888 8 juillet 2008 (08.07.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BAURIN, Nicolas** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **BERNE, Pierre-François** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **BLANCHE, Francis** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **BONO, Françoise** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **CAMERON, Béatrice** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **DABDOUBI, Tarik** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **HERBERT, Corentin** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **MIKOL, Vincent** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis,

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : FGF-R4 RECEPTOR-SPECIFIC ANTAGONISTS

(54) Titre : ANTAGONISTES SPECIFIQUES DU RECEPTEUR FGF-R4

(57) Abstract : The present invention relates to FGF-R4 receptor-specific antagonist molecules enabling the inhibition of the activity of said receptor. Said antagonists are, particularly, FGF-R4-specific antibodies enabling the inhibition of the activity of said receptor. The present invention also relates to the therapeutic use of said antibodies, particularly in the field of angiogenesis and in the treatment of certain types of cancer.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des molécules antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4 permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. Ces antagonistes sont en particulier des anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur FGF-R4 permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. La présente invention a également pour objet l'utilisation thérapeutique de ces anticorps, en particulier dans le domaine de l'angiogenèse, et dans le traitement de certains types de cancer.



WO 2010/004204 A2

Antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4

La présente invention a pour objet des antagonistes spécifiques du récepteur 4 aux FGF (FGF-R4) permettant d'inhiber l'activité de ce récepteur. Ces antagonistes sont en particulier des anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur 4 aux FGF (FGF-R4).

- 5 La présente invention a également pour objet l'utilisation thérapeutique de ces antagonistes, en particulier dans le domaine de l'angiogenèse et dans le traitement de certains types de cancer.

10 Les FGF (Fibroblast Growth Factor) comptent parmi les premières molécules décrites comme étant capables de stimuler la prolifération, la migration et la différenciation des cellules vasculaires *in vitro* et *in vivo*. Une littérature abondante décrit l'induction de l'angiogenèse et la formation de capillaires sanguins *in vitro* et *in vivo* par les FGF. Les FGF sont également impliqués dans l'angiogenèse tumorale en promouvant la formation de vaisseaux sanguins recrutés par la tumeur.

15 La famille des FGF humains est composée d'au moins 23 membres qui possèdent tous un domaine central conservé de 120 acides aminés. Ils exercent leur activité biologique en interagissant avec leurs récepteurs de haute affinité de type tyrosine-kinase (FGF-R) et des héparanes sulfate protéoglycanes, composants présents sur la plupart des surfaces cellulaires et des matrices extracellulaires (site de liaison de 20 faible affinité) pour former un complexe ternaire. Certains FGF présentent une haute affinité pour plusieurs FGF-R alors que d'autres activent spécifiquement un récepteur ou un isoforme d'un récepteur.

25 Un ligand spécifique de FGF-R4 a été identifié par Xie et al (Cytokine, 1999, 11:729-35.) Ce ligand, appelé FGF19, est un ligand de haute affinité au FGF-R4 exclusivement et dont la liaison au récepteur est dépendante de l'héparine ou des héparanes sulfates. Le FGF19 a été identifié chez l'animal adulte, uniquement au niveau des hépatocytes et de l'intestin grêle où il régule la synthèse d'acide biliaire 30 par le foie. Il serait un facteur de croissance intervenant lors du développement embryonnaire et serait impliqué dans le développement du cerveau fœtal chez le poisson zèbre et l'homme.

D'autres ligands de FGF-R4 sont décrits comme le FGF1 ou FGF2. Ces ligands activent fortement le FGF-R4 mais ne sont pas spécifiques de FGF-R4 : ils se lient aussi à d'autres FGF-R (Ornitz et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:15292-7).

- 5 L'activation du récepteur FGF-R4 conduit à plusieurs types de signalisations cellulaires. Parmi celles-ci, la forme la plus classique correspondant à la mise en place d'une voie de signalisation par cascade de phosphorylation à la suite d'une stimulation de FGF-R4 par du FGF. Cette induction conduit à l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase de FGF-R4 et sert à initier une voie de signalisation
- 10 intracellulaire dépendante des phosphorylations d'autres protéines de signalisation telles que AKT, p44/42, JNK etc... Cette signalisation par phosphorylation varie selon le type cellulaire et selon les co-récepteurs ou les molécules d'adhésion présents à la surface de ces cellules. (Cavallaro et al., *Nat. Cell Biol.* 3/7, 650-657 (2001) ; Stadler et al., *Cell. Signal.* 18/6, 783-794. (2006) ; Lin et al., *J Biol Chem.*, 2007, 14:27277-84. (2007)). Un autre mode de signalisation important pour les FGF-R dont FGF-R4 est
- 15 l'internalisation du récepteur après activation en association avec son ligand. Ce mécanisme n'est pas dépendant de l'activité tyrosine kinase du récepteur mais d'une courte séquence en C-terminale de FGF-R4 (Klingenberg et al., *J. Cell Sci.*, 113/Pt10 :1827-1838 (2000)).

20

- Quatre formes distinctes de FGF-R4 sont décrites dans la littérature. Une forme de pleine taille avec 2 variants polymorphiques à la position 388 à savoir le FGF-R4 Gly388 qui est la forme normale du récepteur et la forme Arg388 qui est décrite dans le cadre de plusieurs tumeurs (Bange et al., *Cancer Res.* 62/3, 840-847 (2002) ;
- 25 Spinola et al., *J Clin Oncol* 23, 7307-7311(2005) ; Stadler et al., *Cell. Signal.* 18/6, 783-794. (2006)). Une forme soluble a également été découverte exprimée dans des cellules tumorales mammaires (Takaishi et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, 267:658-62). Une quatrième forme, tronquée dans la partie extracellulaire, a été décrite dans certains adénomes hypophysaires (Ezzat et al., *J Clin Invest.*, 2002,
- 30 109:69-78).

Le FGF-R4 est principalement exprimé dans les tissus dérivés de l'endoderme tels que le tractus gastro-intestinal, le pancréas, le foie, les muscles et les glandes surrénales.

Le FGF-R4 est connu dans la littérature comme ayant plusieurs rôles cellulaires, dont les trois principaux sont décrits dans ce qui suit :

- Premièrement, ce récepteur est impliqué dans le contrôle de différents processus de
- 5 différenciation cellulaire *in vitro* et *in vivo* comme la différenciation et la régénération des muscles squelettiques, la différenciation du tissu mésenchymateux , l'ostéogenèse ou encore dans la formation des alvéoles au cours du développement hépatique post-natal.
- 10 Deuxièmement, le FGF-R4 est décrit dans le contrôle de l'homéostasie de l'acide biliaire et du cholestérol et interviendrait dans le contrôle de l'adiposité. De plus, la balance entre la production de l'acide biliaire et celle du cholestérol est contrôlée par FGF-R4 *in vitro* et *in vivo*.
- 15 Troisièmement, le FGF-R4 est impliqué dans certains phénomènes tumoraux comme le développement des carcinomes hépatocellulaires ou des cancers du colon, dans la prolifération de cellules de fibroadénomes mammaires, de cellules épithéliales de cancers mammaires , comme la motilité des cellules de carcinomes mammaires ou colorectaux L'implication tumorale du FGF-R4 est majoritairement associée à
- 20 l'apparition du polymorphisme (Gly388Arg) corrélée à l'accélération de la progression tumorale de tumeurs mammaires et colorectales (Bange et al., *Cancer Res.* 62/3, 840-847.2002), prostatiques (Wang et al., *Clin. Cancer Res.* 10/18, 6169-6178, 2004) ou hépatiques (Nicholes et al., *Am. J. Pathol.* 160/6, 2295-307, 2002). Ce polymorphisme est aussi associé à un mauvais pronostic dans le cadre de sarcomes
- 25 (Morimoto et al., *Cancer* 98/10, 2245-2250, 2003), d'adénocarcinomes pulmonaires (Spinola et al., *J Clin Oncol* 23, 7307-7311, 2005) ou de sarcomes squameux (da Costa Andrade et al., *Exp Mol Pathol* 82, 53-7, 2007). La surexpression de FGF-R4 est aussi décrite dans certaines lignées de cancers pancréatiques (Shah et al., *Oncogene* 21/54, 8251-61, 2002) et corrèle avec la malignité d'astrocytomes
- 30 (Yamada et al., *Neurol. Res.* 24/3, 244-8, 2002). De plus, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-FGF19 dans des modèles *in vivo* de xénogreffes de tumeurs de colon ou dans des modèles de carcinomes hépatocellulaires, montre que l'inactivation du FGF19 et donc le blocage de l'activation de FGF-R4 peut être bénéfique dans le traitement de cancer du colon ou du foie.

Il est admis dans la littérature que les couples FGF/FGF-R1 et FGF/FGF-R2 participent à la formation des nouveaux vaisseaux sanguins dans un contexte normal ou pathologique. Cependant, l'implication potentielle de FGF-R4 dans le contrôle de ce phénomène cellulaire n'a jamais été étudiée. Il a, en effet, jusqu'à présent été
5 supposé que l'activation de l'angiogenèse est médiée par FGF-R1 et/ou FGF-R2 (Presta et al, Cytokine Growth Factor Rev., 2005, 16 :159-78).

Des exemples d'antagonistes de FGF-R4 sont décrits dans la littérature, notamment:
10 des petites molécules, mais elles ne ciblent pas le FGF-R4 de manière spécifique, entraînant ainsi des effets indésirables. Ainsi des petites molécules chimiques inhibitrices du domaine tyrosine-kinase qui inhibent plusieurs FGF-R ainsi que d'autres récepteur tyrosine-kinase ont été décrites par Thompson et al (Thompson et al *J Med Chem.*, 2000, 43:4200-11.). Des petites molécules chimiques inhibitrices des
15 FGF-R par association à leur partie extracellulaire ont aussi été décrites dans la demande WO2007/080325.

Des anticorps ont aussi été étudiés, comme les anticorps anti-FGFR1 et/ou anti-FGFR4 décrits dans les demandes internationales WO2005/066211 et WO2008052796 ou par Chen et al (*Hybridoma* 24/3, 152-159, 2005). La demande
20 WO2005/037235 décrit des anticorps antagonistes des FGF-R pour le traitement de l'obésité et du diabète. D'autre part, des anticorps anti-FGF-R4 agonistes sont décrits dans la demande WO03/063893.

La présente invention a pour objet un antagoniste du récepteur FGF-R4, caractérisé
25 en ce qu'il se lie spécifiquement à celui-ci.

De manière avantageuse, ledit antagoniste est un anticorps spécifique du récepteur FGF-R4.

Dans un mode de réalisation, l'antagoniste objet de l'invention se lie au domaine D2-
30 D3 du récepteur FGF-R4. Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste objet de l'invention se lie au domaine D2 du récepteur FGF-R4. Dans un mode encore plus avantageux, l'antagoniste se lie à la séquence SEQ ID NO 70.

De manière avantageuse l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 a un K_D vis à vis du récepteur FGF-R4 déterminé par la technique Biacore inférieur à $10E-8$ M, inférieur à $5 \times 10E-9$ M, inférieur à $2 \times 10E-9$ M ou inférieur à $1 \times 10E-9$ M.

- 5 Dans un mode de réalisation avantageux l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est actif à la fois contre FGF-R4 humain et FGF-R4 murin.

Dans un autre mode de réalisation avantageux l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est actif à la fois contre FGF-R4 humain, FGF-R4 murin et FGF-R4 de rat.

- 10 Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend au moins un CDR présentant une séquence identique à SEQ ID NO : 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110 ou au moins un CDR dont la séquence diffère de un à deux acides aminés par rapport aux séquences SEQ ID NO
- 15 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110, pour autant que l'anticorps garde sa spécificité de liaison.

- Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 9, 10,
- 20 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences sus-citées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

- 25 Dans un mode de réalisation avantageux, les anticorps de l'invention comprennent au moins une chaîne lourde et au moins une chaîne légère, ladite chaîne lourde comprenant trois séquences CDR ayant des séquences en acides aminés sélectionnées dans le groupe consistant en SEQ ID NO : 9, 10 et 11 ou 73, 74 et 75, 83, 84 et 85, ou 93, 94 et 95, ou 103, 104 et 105 ladite chaîne légère comprenant trois
- 30 séquences CDR ayant des séquences en acides aminés sélectionnées dans le groupe consistant en SEQ ID NO : 12, 13 et 14 ou 78, 79 et 80, ou 88, 89 et 90, ou 98, 99 et 100, ou 108, 109 et 110.

Dans un mode de réalisation avantageux les parties variables de la chaîne lourde de l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 6, 77, 87, 97 ou 107.

- 5 Dans un mode de réalisation avantageux les parties variables de la chaîne légère de l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 8, 72, 82, 92 ou 102.

- La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une partie variable
10 codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO : 5, 76, 86, 96 ou 106.

- La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une partie variable
15 codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO 7, 71, 81, 91 ou 101.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une partie variable de séquence polypeptidique SEQ ID NO : 6, 77, 87, 97 ou 107.

- 20 La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une partie variable de séquence polypeptidique SEQ ID NO : 8, 72, 82, 92 ou 102.

- La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant des séquences codées par les séquences
25 nucléotidiques SEQ ID NO : 5 et 7 ou 71 et 76, ou 81 et 86, ou 91 et 96, ou 101 et 106.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 6 et 8, ou 72 et 77, ou 82 et 87, ou 92 et 97 ou 102 et 107.

- 30 Dans un mode de réalisation avantageux l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 2 et/ou SEQ ID NO : 4 ; ou SEQ ID NO : 72 et/ou SEQ ID NO : 77 ; ou SEQ ID NO : 82 et/ou SEQ ID NO : 87 ; ou SEQ ID NO : 92 et/ou SEQ ID NO : 97 ; ou SEQ ID NO : 102 et/ou SEQ ID NO : 107.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne lourde codée par une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence

5 SEQ ID NO 1.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde de séquence polypeptidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 2.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du
10 récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère codée par une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 3.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère de séquence polypeptidique
15 identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 4.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et 3.

Dans un mode encore plus avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique de FGF-R4
20 comprend une chaîne lourde comprenant la séquence SEQ ID NO 2 et une chaîne légère comprenant la séquence SEQ ID NO 4.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 2 et d'une séquence légère SEQ ID NO 4 sera appelé 40-12 dans la suite de la demande.

25

Dans un mode de réalisation de l'invention les anticorps spécifiques de FGF-R4 sont actifs à la fois contre FGF-R4 humain, FGF-R4 murin et FGF-R4 de rat.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-
30 R4 induit une inhibition des voies cellulaires AKT/p38.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 induit une inhibition des voies cellulaires Erk1/2.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 induit une inhibition des voies signalisation cellulaire contrôlées par FGF-.R4

Dans un autre mode de réalisation avantageux l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 induit une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale.

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux antagoniste spécifique du
5 récepteur FGF-R4 induit une inhibition de l'angiogenèse.

Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux, l'antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 présente une affinité pour FGF-R4 10 fois supérieure à son affinité pour les autres récepteurs à FGF.

10

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'anticorps selon l'invention est un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

Dans un mode de réalisation l'anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne légère dont la partie variable est codée par
15 une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 29 ou à la séquence SEQ ID NO 31.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne légère dont la partie variable est identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 30 ou à la séquence
20 SEQ ID NO 32.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend une chaîne légère dont la partie variable est codée par une séquence identique à la séquence nucléotidique SEQ ID NO 29 ou à la séquence SEQ ID NO : 31.

25 La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde dont la partie variable est codée par une séquence identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 33, à la séquence SEQ ID NO 35 ou à la séquence SEQ ID NO 37.

30 La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde dont la partie variable est identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 34, à la séquence SEQ ID NO 36 ou à la séquence SEQ ID NO 38.

La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde codée par une séquence nucléotidique SEQ ID NO 33 et/ou SEQ ID NO : 35 et/ou SEQ ID NO : 37.

La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dont les séquences humanisées de séquence SEQ ID NO : 30 ou 32 sont utilisées en combinaison avec les séquences humanisées de séquence SEQ ID NO : 34, 36 ou 38.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 73, 74, 75, 78, 79 et 80 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 83, 84, 85, 88, 89 et 90 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 93, 94, 95, 98, 99 et 100 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 103, 104, 105, 108, 109 et 110 ou des CDR dont les séquences diffèrent de un à deux acides aminés par rapport – respectivement – aux séquences suscitées, pour autant que cela ne modifie pas la spécificité de liaison de l'anticorps au récepteur FGF-R4.

Dans un mode de mise en œuvre préféré de l'invention, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 83, 84, 85, 88, 89 et 90.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne

lourde comprennent une séquence nucléotidique présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 76, 86, 96 ou 106.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne
5 légère comprennent une séquence nucléotidique présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 71, 81, 91 ou 101.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une
10 partie variable codée par une séquence protéique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO : 77, 87, 97 ou 107.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une
partie variable codée par une séquence protéique présentant une identité d'au moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO : 72, 82, 92 ou 102.

15 La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 71 et 76 ou les séquences nucléotidiques
SEQ ID NO : 81 et 86 ou les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 91 et 96 ou les
20 séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 101 et 106.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID
NO : 72 et 77 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 82 et 87 ou les
séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 92 et 97 ou les séquences polypeptidiques
25 SEQ ID NO : 102 et 107.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95%
ou 99% aux SEQ ID NO : 72 et/ou SEQ ID NO : 77.

30 Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 82 et/ou SEQ ID NO : 87.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 92 et/ou SEQ ID NO : 97.

5 Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprend des séquences identiques au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% aux SEQ ID NO : 102 et/ou SEQ ID NO : 107.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention a pour objet un anticorps antagoniste humain spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère
10 codée par une séquence nucléotidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 82 et comprenant une chaîne légère de séquence polypeptidique identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à la séquence SEQ ID NO 87.

De manière encore plus préférée, la présente invention a pour objet un anticorps
15 humain antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 82 et 87.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 77 et d'une séquence légère SEQ ID NO 72 sera appelé clone 8 dans la suite de la demande.

20 L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 87 et d'une séquence légère SEQ ID NO 82 sera appelé clone 31 dans la suite de la demande.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 97 et d'une séquence légère SEQ ID NO 92 sera appelé clone 33 dans la suite de la demande.

L'anticorps composé d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO 107 et d'une
25 séquence légère SEQ ID NO 102 sera appelé clone 36 dans la suite de la demande.

Le champ de la présente invention ne se limite pas aux anticorps comprenant ces séquences. En effet, tous les anticorps qui se lient de manière spécifique à FGF-R4 en ayant une action antagoniste sur ce récepteur, rentrent dans le champ de la
30 présente invention.

La présente invention a également pour objet un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 conjugué à un agent cytotoxique.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement des maladies associées à l'angiogenèse.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement d'un cancer.

- 5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 dans le traitement du cancer du pancréas.

- 10 La présente invention a pour objet un anticorps spécifique du récepteur FGF-R4 utile à la fois dans le traitement des maladies associées à l'angiogenèse et dans le traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique.

La présente invention a pour objet un anticorps spécifique du récepteur FGF-R4 utile à la fois dans le traitement des maladies associées à l'angiogenèse, dans le

- 15 traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique, dans le traitement du cancer du pancréas, des organes du tractus gastro-intestinal ou tout autre organe exprimant FGF-R4.

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant un

- 20 antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 et des excipients.

La présente invention a pour objet une méthode de traitement d'un cancer comprenant l'administration au patient d'un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

- 25 La présente invention a pour objet une méthode de traitement d'une maladie associée à une augmentation pathologique de l'angiogenèse comprenant l'administration au patient d'un anticorps antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

La présente invention a pour objet un procédé de sélection d'un anticorps monoclonal

- 30 antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4, comprenant les étapes suivantes :

- a. immunisation chez la souris
- b. prélèvement de nodules lymphatiques chez les souris, et
- c. criblage des surnageants d'hybridomes

La présente invention a pour objet une lignée cellulaire produisant des anticorps antagonistes spécifiques du récepteur FGF-R4.

La présente invention a pour objet un procédé de production d'un anticorps
5 antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant la mise en culture d'une lignée cellulaire produisant des anticorps antagonistes du récepteur FGF-R4.

La présente invention a pour objet un médicament comprenant un antagoniste spécifique du récepteur FGF-R4.

10

La présente invention a également pour objet un polynucléotide codant pour un polypeptide sélectionné dans le groupe constitué des SEQ ID NOS : 2, 4, 6, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 30, 32, 34, 36, 38, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 110 et des
15 séquences identique au moins à 80%, 90%, 95% ou 99% à l'une de ces séquences.

La présente invention a pour objet un vecteur recombinant comprenant un polynucléotide tel que décrit ci dessus ou codant pour un polypeptide tel que décrit ci dessus.

20

Afin de permettre l'expression de chaînes lourdes et/ou chaînes légères de l'anticorps antagoniste du récepteur FGF-R4, objet de l'invention, les polynucléotides codant pour lesdites chaînes sont insérés dans des vecteurs d'expression. Ces vecteurs d'expression peuvent être des plasmides, des YACs, des cosmides, des rétrovirus,
25 des épisomes dérivés d'EBV, et tous les vecteurs que l'homme du métier peut juger appropriés à l'expression desdites chaînes.

La présente invention a pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus.

30

Description détaillée de l'invention

La présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre FGF-R4 (sans réaction croisée avec FGF-R1, R2 ou R3) pour l'inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale.

- 5 De façon inattendue, les inventeurs ont montré que le FGF-R4 joue un rôle actif et spécifique dans le contrôle de l'angiogenèse.

Cette fonction du FGF-R4 n'avait jamais été montrée ou proposée auparavant. Par conséquent, ce récepteur peut être utilisé en tant que cible pour traiter les pathologies
10 présentant un dysfonctionnement angiogénique. Les ligands du FGF-R4 capables de moduler son activité sont donc des agents thérapeutiques potentiels pour de nombreuses pathologies liées à l'angiogenèse.

La présente invention peut donc être utilisée dans le traitement de toutes les
15 pathologies impliquant une dérégulation de l'angiogenèse et nécessitant une inhibition de celle-ci. Les pathologies visées peuvent être le cancer, avec l'utilisation des antagonistes selon l'invention comme inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale, ou les pathologies pour lesquelles une dérégulation de l'angiogenèse est décrite comme : la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA, les maladies inflammatoires comme
20 l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, les colites, les ulcères ou toute maladie inflammatoire des intestins, l'athérosclérose ou encore dans le traitement de l'obésité. L'utilisation de ces anticorps est aussi illustrée dans l'inhibition de la croissance tumorale. Les antagonistes selon la présente invention peuvent donc être utilisés pour le traitement de certains cancers impliquant une dérégulation du FGF-R4, et plus
25 particulièrement les cancers du foie, du colon, du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas, de la peau ou de l'œsophage.

Un des avantages majeurs des antagonistes selon la présente invention est de cibler spécifiquement un récepteur aux FGF, en l'occurrence FGF-R4. Cette spécificité
30 permet de limiter les effets indésirables que peuvent avoir des petites molécules chimiques inhibitrices du domaine tyrosine kinase. De plus, le FGF-R4 n'étant pas exprimé de manière ubiquitaire, mais étant notamment exprimé sur les cellules endothéliales comme sur les cellules hépatocytaires, biliaires, mammaires, prostatiques, ovariennes, pancréatiques, rénales, on dispose d'un mode de traitement

des maladies liées à une dérégulation de l'activité FGF-R4 limitant les effets secondaires.

Par « antagoniste », on entend tout ligand capable de diminuer ou d'inhiber
5 totalement l'activité du FGF-R4. Ce composé antagoniste est aussi appelé inhibiteur de FGF-R4.

Cet antagoniste peut-être tout ligand de FGF-R4 tel qu'une molécule chimique, une protéine recombinante, un oligosaccharide, un polysaccharide, un oligonucléotide ou
10 un anticorps capable de se lier de manière spécifique au récepteur FGF-R4, à l'exclusion de tout autre FGFR.

Un objet de l'invention est donc un antagoniste spécifique de FGF-R4. Selon l'invention, un antagoniste qui se lie spécifiquement au FGF-R4 s'entend d'un ligand
15 qui ne se lie aux autres récepteurs aux FGF à savoir FGF-R1, FGF-R2 ou FGF-R3. En particulier, un anticorps spécifique de FGF-R4 est un anticorps qui ne présente pas de réaction croisée avec FGF-R1, FGF-R2 ou FGF-R3.

Une liaison spécifique s'entend d'une différence d'un facteur au moins 10 entre l'intensité de la liaison à un récepteur par rapport à un autre, ici entre la liaison à FGF-
20 R4 et les liaisons possibles à FGF-R1, FGF-R2 ou FGF-R3.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le ligand de FGF-R4 est un oligosaccharide ou un polysaccharide.

Un oligosaccharide s'entend de tout polymère de saccharide contenant de trois à dix
25 unités de sucres simples. Il existe des oligosaccharides naturels, comme par exemple les fructo-oligosaccharides (FOS), et des oligosaccharides de synthèse comme par exemple les anti-thrombotiques mimétiques de l'héparine.

Par « polysaccharide », on entend tout polymère constitué de plus de dix monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Il existe des
30 polysaccharides naturels, comme par exemple les mucopolysaccharides, les fucoïdes, les carraghénanes, les exopolysaccharides bactériens et des polysaccharides de synthèse. Ainsi, des fucoïdanes de bas poids moléculaires ou des exopolysaccharides très sulfatés ont montré des activités pro-angiogène (Chabut et al., *Mol Pharmacol.*, 2003, 64:696-702 ; Matou et al., *Biochem Pharmacol.*, 2005,

69:751-9.). A l'inverse, des oligosaccharides faiblement sulfatés dérivés de l'héparine ou des phosphomannopentose sulfate peuvent présenter des caractéristiques anti-angiogènes (Parish et al., 1999, 15:3433-41 ; Casu et al., *J Med Chem.*, 2004, 12:838-48)

5

Dans un mode de réalisation de l'invention, le ligand de FGF-R4 est un anticorps.

Par « anticorps », on entend tout type d'anticorps ou molécules dérivés tels que les anticorps polyclonaux et monoclonaux. Parmi les molécules dérivées des anticorps
10 monoclonaux, sont compris les anticorps humanisés, les anticorps humains, les anticorps multispécifiques, les anticorps chimériques, les fragments d'anticorps, les nanobodies...

Dans un mode de réalisation de l'invention, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un
15 anticorps polyclonal.

Un « anticorps polyclonal » est un anticorps qui a été produit parmi un mélange d'anticorps provenant de plusieurs clones de lymphocytes B et reconnaissant une série d'épitopes différents.

20 Dans un mode de réalisation avantageux, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un anticorps monoclonal.

Un « anticorps monoclonal » est un anticorps obtenu à partir d'une population d'anticorps substantiellement homogène issue d'un seul type de lymphocytes B amplifiée de manière clonale. Les anticorps formant cette population sont identiques
25 excepté pour de possibles mutations naturelles pouvant être présentes en quantité très faible. Ces anticorps sont dirigés contre un seul épitope et sont donc hautement spécifiques.

Par « épitope » on entend le site de l'antigène auquel se lie l'anticorps. Si l'antigène
30 est un polymère, tel une protéine ou un polysaccharide, l'épitope peut être formé par des résidus contigus ou non-contigus.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'anticorps antagoniste anti-FGF-R4 se lie à un épitope appartenant au domaine D2-D3 du récepteur au FGF-R4.

Dans un mode encore plus avantageux, l'anticorps se lie à un épitope compris dans le domaine comprenant les acides aminés 144 à 365 du récepteur au FGF-R4.

Dans un mode encore plus avantageux, l'anticorps se lie à un épitope compris dans le domaine D2 du récepteur au FGF-R4, cet épitope correspondant aux acides aminés
5 145 à 242 décrits dans la séquence SEQ ID NO 70.

Un anticorps, aussi appelé immunoglobuline, est composé de deux chaînes lourdes identiques (« VH ») et de deux chaînes légères identiques (« VL ») qui sont liées par un pont disulfure. Chaque chaîne contient une région constante et une région
10 variable. Chaque région variable comprend trois segments appelés « régions déterminant la complémentarité » (« CDRs ») ou « régions hypervariables », qui sont principalement responsables de la liaison à l'épitope d'un antigène.

Le terme « VH » fait référence aux régions variables d'une chaîne lourde d'immunoglobuline d'un anticorps, incluant les chaînes lourdes d'un fragment Fv,
15 scFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab)'.

Le terme « VL » fait référence aux régions variables d'une chaîne légère d'immunoglobuline d'un anticorps, incluant les chaînes légères d'un fragment Fv,
20 scFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab)'.

Par « fragment d'anticorps » on entend toute partie de celui-ci : Fab (Fragment antigen binding), Fv, scFv (single chain Fv), Fc (Fragment cristallisable). De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab,
25 F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diabodies, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal, chimérique ou humanisé dont ils sont issus. Selon la présente invention, des fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés, par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne
30 et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique.

Par « régions CDR ou CDRs », on entend désigner les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines comme définies par Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S.

Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Il existe 3 CDRs de chaîne lourde et 3 CDRs de chaîne légère. Le terme CDR ou CDRs est utilisé ici pour désigner suivant les cas, l'une de ces régions ou plusieurs, voire l'ensemble, de ces régions qui contiennent la majorité des résidus d'acides aminés responsables de la liaison affine de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope qu'il reconnaît. Les régions les plus conservées des domaines variables sont appelés régions ou séquences FR pour « framework » ou régions « charpentes ».

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un anticorps chimérique.

Par « anticorps chimérique » on entend un anticorps dans lequel la région constante, ou une portion de celle-ci, est altérée, remplacée ou échangée, telle que la région variable est liée à une région constante d'une espèce différente, ou appartient à une autre classe ou sous-classe d'anticorps.

On entend également par « anticorps chimérique » un anticorps dans lequel la région variable, ou une portion de celle-ci, est altérée, remplacée ou échangée, telle que la région constante est liée à une région variable d'une espèce différente, ou appartient à une autre classe ou sous-classe d'anticorps.

Les méthodes de production d'anticorps chimériques sont connues de l'homme du métier. Voir par exemple, Morrison, 1985, *Science*, **229** :1202 ; Oi *et al.*, 1986, *Bio Techniques*, 4 :214 ; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods*, **125** :191-202 ; U.S. Pat. Nos. 5,807,715 ; 4,816,567 ; and 4,816,397.

Ces versions chimériques de l'anticorps peuvent consister en la fusion des parties variables VL et VH aux parties constantes de Ckappa et CH (IgG1) d'origine humaine afin de générer un anticorps monoclonal chimère.

La partie CH (IgG1) peut aussi être modifiée par des mutations ponctuelles afin d'augmenter l'affinité du fragment Fc pour le récepteur FcγRIIIa et par là même augmenter les fonctions effectrices de l'anticorps (Lazar *et al.*, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 : 4005-4010 ; Stavenhagen *et al.*, 2007, *Cancer Res.* **67** : 8882-8890).

La présente invention inclut les versions humanisées des anticorps.

Par « anticorps humanisé » on entend un anticorps qui contient principalement des séquences immunoglobuline humaines. Ce terme fait généralement référence à une immunoglobuline non humaine qui a été modifiée par incorporation de séquences humaines ou de résidus trouvés dans des séquences humaines.

5

En général, les anticorps humanisés comprennent un ou typiquement deux domaines variables dans lesquels tout ou partie des régions CDR correspondent à des parties issues de la séquence parente non humaine et dans lesquels tout ou partie des régions FR sont ceux issus d'une séquence immunoglobuline humaine. L'anticorps humanisé peut alors comprendre au moins une portion d'une région constante d'immunoglobuline (Fc), en particulier celle de l'immunoglobuline humaine de référence choisie.

10

On cherche ainsi à obtenir un anticorps qui soit immunogène a minima chez un humain. Ainsi il est possible qu'un ou deux acides aminés d'un ou plusieurs CDRs soient modifiés par un acide aminé moins immunogène pour l'hôte humain, ceci sans réduire substantiellement la spécificité de liaison de l'anticorps au FGF-R4,. De même, les résidus des régions charpentes peuvent ne pas être humains et il est possible qu'ils ne soient pas modifiés car ils ne contribuent pas au potentiel immunogénique de l'anticorps.

15

20

Il existe plusieurs méthodes d'humanisation connues de l'homme du métier pour modifier un anticorps parent non-humain en un anticorps moins immunogène pour l'humain. Une identité globale des séquences avec un anticorps humain n'est pas forcément nécessaire. En effet l'identité globale de séquence n'est pas nécessairement un indicateur prédictif d'une immunogénicité réduite et la modification d'un nombre limité de résidus peut conduire à des anticorps humanisés présentant un potentiel immunogénique très atténué chez l'homme (Molecular Immunology (2007) 44, 1986-1998).

25

Diverses méthodes sont par exemple l'inclusion de CDRs (grafting) (EPO 0 239 400; WO 91/09967; et U.S. Pat. Nos. 5,530,101 et 5,585,089), le resurfaçage (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; et Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) ou encore le mélange des chaînes (U.S. Pat. No. 5,565,332).

30

La présente invention concerne en particulier des anticorps humanisés dont les parties variables sont modifiées selon la technologie suivante:

Les chaînes légères et lourdes les plus similaires aux chaînes correspondantes de l'anticorps murin anti-FGF-R4 40-12 sont identifiées par comparaison à la Protein Data Bank (H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. Nucleic Acids Research, 2000, 28 :235-242). L'alignement de séquences utilise l'algorithme BLAST (J Mol Biol. 1990 Oct 215:403-410). Il s'agit des structures tridimensionnelles répondant aux codes PDB 1NDM & 10 1ETZ qui ont été respectivement utilisées pour construire les modèles par homologie des chaînes légères et lourdes des domaines variables. Ces modèles tridimensionnels sont ensuite affinés en minimisant leur énergie potentielle avec la procédure standard implémentée dans le logiciel MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Quebec, Canada). Une simulation de 15 dynamique moléculaire (DM) est ensuite réalisée à partir de ces modèles tridimensionnels minimisés de l'anticorps avec le logiciel Amber (D.A. Case, T.E. Cheatham, III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. Woods. J. Computat. Chem. 2005, 26 :1668-1688). Cette simulation a lieu avec des contraintes harmoniques appliquées aux atomes du 20 squelette protéique à une température de 500K pendant une durée de 1,1 nanoseconde dans un modèle de solvant implicite tel qu'implémenté dans la méthode généralisée de Born (Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499). Dix conformations diverses sont ainsi extraites de cette première simulation à raison d'une conformation tridimensionnelle toutes les cent picosecondes pendant la 25 dernière nanoseconde de la simulation. Ces dix conformations diverses sont ensuite chacune soumises à une simulation de dynamique moléculaire, sans contraintes sur le squelette protéique, à une température de 27 °C pendant 2,3 nanosecondes dans un modèle de solvant implicite tel qu'implémenté dans la méthode généralisé de Born. Les liaisons impliquant un atome hydrogène sont contraintes avec l'algorithme 30 SHAKE (Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), le pas est de 1 femto seconde, et la simulation a lieu selon l'équation de Langevin à volume constant et une température constante de 27°C. Pour chacune des dix simulations de dynamique moléculaire, les dernières deux mille conformations, extraites à la fréquence d'une par picoseconde, sont ensuite utilisées pour quantifier, pour chaque acide-aminé de

l'anticorps à humaniser, la déviation des positions des atomes par rapport à une conformation moyenne, dite médoïde, de l'acide aminé. L'ensemble de l'analyse décrite ci-après est réalisée avec le langage de script Scientific Vector Language (SVL) du logiciel MOE. La conformation médoïde de l'acide aminé est la conformation

5 issue de la dynamique moléculaire qui est la plus proche de la conformation moyenne calculée à partir de la position des atomes de toutes les conformations de l'acide aminé. La distance utilisée pour détecter la conformation médoïde est l'écart quadratique moyen des distances scalaires entre les atomes de deux conformations de l'acide aminé. De manière similaire, la déviation des positions des atomes d'une

10 conformation d'un acide-aminé par rapport à la conformation médoïde est quantifiée en calculant l'écart quadratique moyen des distances scalaires entre les atomes de l'acide aminé d'une conformation de la simulation et les mêmes atomes de la conformation médoïde. Par la suite, c'est en comparant l'écart quadratique moyen des positions des atomes d'un acide amine donné (i) moyenné sur l'ensemble des dix

15 simulations de dynamique moléculaire (F_i), à l'écart quadratique moyen des positions de tous les acides-aminés de l'anticorps moyenné sur l'ensemble des dix simulations de dynamique moléculaire (F_m) que l'on décide si l'acide-aminé est assez flexible pour être considéré comme pouvant potentiellement interagir avec les récepteurs de cellules T et provoquer l'activation du système immunitaire. Un acide-aminé i est

20 considéré comme flexible s'il présente un score de flexibilité Z_i au-dessus de 0,15 tel que défini ci-après : $Z_i = (F_i - F_m)/F_m$. 45 acides-aminés sont ainsi identifiés comme flexible dans le domaine variable de l'anticorps, à l'exclusion de la région déterminant la complémentarité à l'antigène (RDC) et de son environnement immédiat. On définit l'environnement immédiat de la RDC comme tout acide-aminé dont le carbone alpha

25 se situe à une distance de 5 angströms (Å) ou moins d'un carbone alpha de la RDC.

Les mouvements des 60 acide-aminés les plus flexibles de l'anticorps, pendant les 20 nanosecondes (10x2ns) de simulation, sont ensuite comparés aux mouvements des acide-aminés correspondants de 49 modèles par homologie de séquences

30 germinales humaines d'anticorps, pour chacun desquels les dix simulations de dynamique moléculaire (10x2ns) ont été réalisées selon le même mode opératoire. Les 60 acide-aminés les plus flexibles excluent la région déterminant la complémentarité à l'antigène (RDC) et son environnement immédiat. Les 49 modèles humains de séquences germinales d'anticorps ont été construits en combinant

systématiquement les 7 chaînes légères humaines les plus fréquentes (vk1, vk2, vk3, vk4, vlamba1, vlamba2, vlamba3) et les 7 chaînes lourdes humaines les plus fréquentes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

5

La similarité de l'anticorps à humaniser aux 49 modèles de séquences humaines germinales est quantifiée en échantillonnant les positions de certains atomes des 60 acides-aminés flexibles d'un anticorps, au cours des dix dynamiques moléculaires, au moyen d'une même grille cubique tridimensionnelle de résolution 1Å. On parle de

10 similarité quadridimensionnelle. La grille tridimensionnelle utilisée comporte 445740 points et elle est initialisée à partir de la structure tridimensionnelle de l'anticorps humain répondant au code PDB 8FAB. La structure 8FAB est aussi utilisée pour positionner toutes les conformations d'un anticorps à échantillonner dans la grille tridimensionnelle. On superpose pour ce faire la conformation médoïde de la

15 dynamique moléculaire de l'anticorps sur la structure 8FAB. Cette superposition consiste en l'alignement des moments d'inertie des deux conformations, suivi de l'optimisation des distances scalaires entre les atomes de carbone alpha des deux conformations. Toutes les autres conformations de la dynamique moléculaire de l'anticorps sont superposées sur la conformation médoïde selon la même méthode.

20 Deux types d'échantillonnage sont réalisés résultant en deux similarités (similarité électrostatique et similarité lipophile), pour un couple d'anticorps à comparer, que l'on additionne pour obtenir la similarité totale. Le premier échantillonnage, électrostatique, considère tous les atomes de la chaîne latérale de l'acide-aminé. La valeur en un point x de la grille se calcule en appliquant aux atomes de la chaîne

25 latérale de l'acide aminés une fonction gaussienne tridimensionnelle $f(x)$ que l'on pondère avec la charge électrostatique de l'atome telle que décrite dans le champ de force Amber99 (Cieplak, J., et al.; J. Comp. Chem. 2001, 22 :1048-1057). La fonction $f(x)$ est appliquée selon les 3 axes de coordonnées cartésiennes et répond à la formule : $f(x) = \left(s\sqrt{2\pi}\right)^{-3} \times \exp\left(\frac{-(x-u)^2}{2s^2}\right)$, avec x et u respectivement coordonnées

30 cartésiennes d'un point x de la grille et d'un atome échantillonné, $s = r/1,6$ (r = rayon de covalence de l'atome). L'échantillonnage est répété pour toutes les conformations de l'acide aminé et les résultats obtenus sont moyennés en tout point x de la grille tridimensionnelle. Le deuxième échantillonnage, lipophile, considère uniquement les atomes lipophiles de la chaîne latérale de l'acide aminé. La valeur en un point x de la

grille se calcule à l'aide de la même fonction gaussienne $f(x)$ sans pondération. Les deux ensembles de conformations des dynamiques moléculaires des deux anticorps que l'on compare sont ainsi échantillonnés par la même grille tridimensionnelle. On mesure la similarité électrostatique (*sim-elec*), entre 2 anticorps a et b, à l'aide de la

5 formule suivante :
$$sim - elec = \frac{\sum_{i=1}^{445740} \left(\left| x_i^a + x_i^b \right| - \left| x_i^a - x_i^b \right| \right)}{\sum_{i=1}^{445740} \left(\left| x_i^a + x_i^b \right| \right)}$$
. La similarité lipophile est

calculée avec la même formule sur les données issues de l'échantillonnage lipophile décrit ci-dessus.

Le modèle de séquences germinales humaines vlambda2-vh2 montre ainsi la plus forte similarité quadridimensionnelle (similarité totale = 58 %) de ces 60 acide-aminés flexibles par rapport aux acide-aminés flexibles de l'anticorps murin 40-12. Le modèle de séquence germinale humaine vlambda2-vh2 a donc été utilisé pour humaniser l'anticorps à humaniser en se focalisant sur les 45 acide-aminés flexibles. Pour déterminer les mutations à opérer, la structure tridimensionnelle du modèle de l'anticorps murin 40-12 est superposée à celle du modèle issu des séquences germinales montrant la plus forte similarité en optimisant les positions des carbones alpha des acides aminés. Les acides aminés identifiés comme flexibles sont mutés par les acides aminés correspondant dans la séquence du modèle montrant la plus forte similarité.

Les motifs de séquences indésirables considérés sont les suivants: Aspartate-Proline (liaison peptidique labile en milieu acide), Asparagine-X-Serine/Thréonine (site de glycosylation, X=tout acide-aminé sauf Proline), Aspartate-Glycine/Serine/Thréonine (formation potentielle de succinimide/iso-aspartate dans les zones flexibles), Asparagine-Glycine/Histidine/Serine/Alanine/Cystéine (sites exposés de déamidation), Methionine (oxydation dans les zones exposées). Les séquences humanisées ainsi obtenues sont finalement comparées, au moyen de l'algorithme BLAST de comparaison de séquence, aux séquences de la base de données IEDB (<http://www.immuneepitope.org/> The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. PLoS Biol. 2005 Mar;3(3):e91) pour s'assurer que les séquences ne contiennent pas d'épitopes connus pour être reconnu par les cellules lymphocytes B et T. Si la séquence contient des résidus qui présentent des séquences indésirables, elles sont alors aussi modifiées. Si la séquence composite

contient un épitope connu répertorié dans l'IEDB, une autre structure de référence germinale montrant une forte similarité est alors utilisée comme modèle.

De manière plus avantageuse, l'anticorps selon l'invention comprend des séquences
5 présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO 30 ou la séquence SEQ ID NO 32 sont utilisées, en combinaison avec les séquences présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO 34, séquence SEQ ID NO 36 ou la séquence SEQ ID NO 38.

10 Dans un mode de réalisation, l'anticorps selon l'invention comprend des chaînes variables légères de séquence SEQ ID NO 30 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 34.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquence SEQ ID NO 32 et des chaînes variables lourdes de séquence
15 SEQ ID NO 38.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquence SEQ ID NO 30 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 36.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend des chaînes variables
20 légères de séquence SEQ ID NO 32 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 34.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquences SEQ ID NO 32 et des chaînes variables lourdes de séquence
25 SEQ ID NO 36.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps comprend des chaînes variables légères de séquences SEQ ID NO 30 et des chaînes variables lourdes de séquence SEQ ID NO 38.

30 La présente invention a également pour objet des anticorps humains antagonistes spécifiques du FGF-R4. De tels anticorps peuvent être obtenus par phage display selon des méthodes connus de l'homme du métier (McCafferty J. *et al*, 1990 ; Hoogenboom, HR *et al*, 2005). D'autres technologies sont disponibles pour la

préparation d'anticorps humains telles que la technologie XenoMouse décrite dans le brevet U.S. 5,939,598.

Dans un mode de réalisation particulier, l'anticorps antagoniste spécifique du
5 récepteur FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne
lourde comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99%
d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 76, 86, 96 ou 106.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps antagoniste spécifique du récepteur
FGF-R4 est un anticorps humain dont les parties variables de la chaîne légère
10 comprennent une séquence présentant au moins 80%, 90%, 95% ou 99% d'identité
avec la séquence SEQ ID NO : 71, 81, 91 ou 101.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste
spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne lourde comprenant une
partie variable codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au
15 moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO 77, 87, 97 ou 107.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste
spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant une chaîne légère comprenant une
partie variable codée par une séquence nucléotidique présentant une identité d'au
moins 80%, 90%, 95% ou 99% avec la séquence SEQ ID NO 72, 82, 92 ou 102.

20

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste
spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant des séquences codées par les
séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 71 et 76 ou les séquences nucléotidiques
SEQ ID NO : 81 et 86 ou les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 91 et 96 ou les
25 séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 101 et 106.

La présente invention a également pour objet un anticorps humain antagoniste
spécifique du récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID
NO : 72 et 77 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 82 et 87 ou les
séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 92 et 97 ou les séquences polypeptidiques
30 SEQ ID NO : 102 et 107.

De manière particulièrement préférée, un anticorps humain antagoniste spécifique du
récepteur FGF-R4 comprenant les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 82 et 87.

Les séquences en acides aminés ainsi modifiées peuvent aussi être modifiées par des modifications post-traductionnelles au cours de la production dans la cellule mammifère. En particulier l'emploi de lignées stables déficientes dans la biosynthèse du fucose peut permettre de produire des anticorps monoclonaux dont le N-glycan du Fc (position N297) est dépourvu partiellement ou totalement de fucose et permet d'augmenter l'effet effecteur ADCC (Kanda *et al.*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94 :680-688 et Ripka *et al.*, 1986 *Arch Biochem Bioph* 249 : 533-545).

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'antagoniste spécifique de FGF-R4 est un anticorps conjugué.

Les anticorps peuvent être conjugués à un agent cytotoxique. Le terme « agent cytotoxique » désigne ici une substance qui réduit ou bloque la fonction, ou la croissance, des cellules, ou cause la destruction des cellules.

Dans un mode de réalisation, l'anticorps ou un fragment de liaison de celui-ci peut-être conjugué à un médicament, tel qu'un maytansinoïde, pour former un « pro-médicament » ayant une cytotoxicité envers les cellules exprimant l'antigène.

L'agent cytotoxique de la présente invention peut-être tout composé qui résulte en la mort d'une cellule, ou induit la mort d'une cellule, ou diminue de diverses façons la viabilité des cellules. Les agents cytotoxiques préférés incluent, par exemple, des maytansinoïdes et analogues de maytansinoïdes, des taxoïdes, CC-1065 et analogues de CC-1065, dolastatine et analogue de dolastatine, définis ci-dessus. Ces agents cytotoxiques sont conjugués à des anticorps, fragments d'anticorps, équivalents fonctionnels, anticorps améliorés et leurs analogues comme décrits dans la présente demande.

Les anticorps conjugués peuvent-être préparés par des méthodes *in vitro*. Afin de lier un médicament ou un pro-médicament à l'anticorps on utilise un groupe de liaison. Des groupes de liaison appropriés sont bien connus de l'homme du métier et incluent notamment les groupes disulfides, les groupes thioéther, les groupes acides labiles, les groupes photolabiles, les groupes peptidases labiles et les groupes estérases labiles. Des groupes de liaison préférés sont les groupes disulfides et les groupes thioéther. Par exemple, un conjugué peut-être construit en utilisant une réaction

d'échange disulfide ou en formant un pont thioéther entre l'anticorps et le médicament ou pro-médicament.

Des composés tels que : le méthotraxétate, le daunorubicin, le vincristine, le vinblastine,
5 le melphalan, le mitomycine C, le chlorambucil, le calichamicin, le tubulysin et les
analogues du tubulysin, le duocarmycine et les analogues du duocarmycine, le dolastatin
et les analogues du dolastatin sont également appropriés pour la préparation de
conjugués de la présente invention. Les molécules peuvent aussi être liées aux molécules
d'anticorps par une molécule intermédiaire telle que la sérum albumine. La doxorubicine
10 et les composés de doxorubicine, comme décrits par exemple dans la demande de brevet
US 09/740991, peuvent aussi être des agents cytotoxiques utiles.

Les anticorps objet de la présente invention peuvent-être associés à une molécule ou
un composé cytotoxique. Ils peuvent aussi être associés à un composé anti-
angiogénique agissant sur d'autres voies de l'angiogenèse.

15

Par « cellules exprimant le FGF-R4 », on entend toute cellule eucaryote, notamment
de mammifères et en particulier humaine, qui exprime un récepteur FGF-R4 sous sa
forme native, sous une forme mutée. Le FGF-R4 peut également être sous sa forme
entière ou sous une forme tronquée comprenant par exemple le domaine extra-
20 cellulaire de FGR-R4, et en particulier les domaines D2-D3. Le FGF-R4 peut
également être recombiné sous une forme chimérique.

Les composés de l'invention peuvent être formulés dans des compositions
pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale,
25 intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.
Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules
pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en
particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de
sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc., ou des mélanges de tels sels),
30 stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par
addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la
constitution de solutés injectables.

Les pathologies visées peuvent être toutes les maladies liées à l'angiogenèse, tumorale ou non tumorale.

Les pathologies visées peuvent être le cancer (avec l'utilisation de l'invention comme inhibiteur de l'angiogenèse tumorale), notamment le cancer du foie, du colon, du sein,
5 ou du poumon, prostate, pancréas ou de la peau, ou encore des pathologies pour lesquelles une dérégulation de l'angiogenèse est décrite comme : la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA, les maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, les colites, les ulcères ou toute maladie inflammatoire des intestins, l'athérosclérose ou encore dans le traitement de l'obésité.

- 10 Les anticorps anti-FGF-R4 peuvent également être utilisés pour traiter le cancer, notamment les hépatocarcinomes et autres cancers hépatiques, et le cancer du pancréas en tant qu'inhibiteur ayant une action directement sur la croissance tumorale.
- 15 La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples qui suivent.

Description des figures

- 20 **Figures 1A et 1B** : *In vitro* (Fig 1A) des cellules endothéliales humaines de type HUVEC sont capables de former un réseau de pseudotubules appelé angiogenèse. Ce réseau est stimulé par l'ajout de 1 ng/ml de FGF2. Cette induction peut être également obtenue par l'ajout de 10 ng/ml de FGF19, ligand spécifique de FGF-R4 alors que 10 ng/ml de FGF4 (ligand non activateur de FGF-R4) ne sont pas capables
25 de stimuler l'angiogenèse. De la même façon, *in vivo*, (Fig 1B) dans un modèle murin d'induction de l'angiogenèse au niveau d'implant d'éponge sur le dos de la souris, le FGF2 est capable d'induire le recrutement de néo-vaisseaux fonctionnels vers l'éponge se caractérisant par une augmentation du contenu en hémoglobine de ces éponges en comparaison du contrôle. Le FGF19 est capable également d'induire
30 cette angiogenèse au niveau de l'éponge.

Figure 2A : Carte du plasmide pXL4614 permettant l'expression de hFGFR4-Histag. (SEQ ID NO 40)

Figure 2B : Carte du plasmide pXL4613 permettant l'expression de hFGFR4-Streptag. (SEQ ID NO 69).

Figure 3 : Carte du plasmide pXL4615 permettant l'expression de hFGFR4(D2,D3)-Histag. (SEQ ID NO 42)

Figure 4 : Carte du plasmide pXL4621 permettant l'expression de mFGFR4-Histag. (SEQ ID NO 44)

Figure 5 : Carte du plasmide pXL4328 permettant l'expression de hFGFR1-Fc (de séquence SEQ ID NO 46)

Figure 6 : Carte du plasmide pXL4327 permettant l'expression de hFGFR2-Fc (de séquence SEQ ID NO 48)

Figure 7 : Des plaques ELISA sont recouvertes par les 4 récepteurs humains aux FGF. La capacité des anticorps anti-FGFR4 40-12 et 64-12 à reconnaître ces différents FGF-Rs est mesurée par dosage ELISA. Le clone 40-12 (histogramme noir) est spécifique de FGF-R4. Le clone 64-12 (histogramme gris) reconnaît en plus très faiblement le FGF-R3.

Figures 8A et 8B : L'anticorps antagoniste actif 40-12 et son contrôle inactif 64-12 n'ont pas d'effet propre sur l'angiogenèse basale. Par contre, à la dose de 30 µg/ml (200 nM environ), l'anticorps monoclonal anti-FGFR4 40-12 est capable d'inhiber l'angiogenèse de cellules HUVEC induite par le FGF2 alors que l'anticorps contrôle 64-12 n'en est pas capable (Fig 8A).

Du FGF2 marqué à l'aide d'un AlexaFluor® 488 nm est capable de se lier au FGF-R4 exprimé par des cellules 300-19 (histogramme blanc). Cette interaction peut être dissociée par du FGF2 non marqué (histogrammes noirs) ou par l'anticorps anti-FGFR4 40-12 (histogrammes gris foncés) alors que l'anticorps témoins 64-12 n'en n'est pas capable (histogrammes gris clairs) (Fig 8B).

Figure 8C et 8D : Effet des anticorps anti-FGFR4 issus des clones 8, 31, 33 et 36 à 10µg/ml sur l'angiogenèse *in vitro* induite par 3 ng/ml de FGF-2. Les clones 8 (Fig 8C)

et 31, 33 et 36 (Fig 8D) inhibent l'angiogenèse de cellules HUVEC induite par le FGF-2.

Figures 9A et 9B : Des cellules d'hépatocarcinomes humains Hep3b sont stimulées par du FGF19 à 30 ng/ml. Cette stimulation induit une signalisation cellulaire spécifique de FGF-R4 aboutissant à la synthèse des protéines cFos et JunB et à la phosphorylation de Erk1/2 observé par Western-blot (Fig 9A). Chaque bande est alors quantifiée. Cette quantification est représentée sous forme d'histogramme (Fig 9B). L'anticorps 40-12 à 100 µg/ml inhibe totalement l'induction de la signalisation cellulaire spécifique de FGF-R4 alors que l'anticorps contrôle n'a aucun effet. En effet, l'anticorps 40-12 bloque complètement la synthèse de JunB et de cFos ainsi que la phosphorylation de Erk1/2 induite par le FGF19 après une simulation de 3h.

Figure 9C : L'effet inhibiteur de l'anticorps anti-FGFR4 40-12 sur la phosphorylation de Erk1/2 induite dans les cellules Hep3b par le FGF-19 (30 ng/ml) est confirmée à l'aide de l'ELISA anti-phosphoERK1/2. L'anticorps 40-12 est aussi capable d'inhiber la phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules Hep3b stimulées par du FGF-2 (1 ng/ml) ou par du sérum (SVF) à 10%.

Figure 9D : Pourcentage d'inhibition de la phosphorylation de Erk1/2 induite par le FGF-19 (30ng/ml) obtenue par ELISA sur cellules Hep3b à l'aide des anticorps issus des clones 8, 31, 33 et 36.

Figures 10A et 10B : La prolifération de cellules Hep3b peut être stimulée par l'ajout de sérum (Fig 10A) ou de FGF19 (Fig 10B). L'induction par le sérum est partiellement inhibée par l'anticorps 40-12 à 100 µg/ml alors que l'anticorps contrôle n'a pas d'effet (Fig 10A). La prolifération induite par le FGF19 est totalement bloquée par 10 µg/ml d'anticorps anti-FGFR4 40-12 alors qu'à cette même dose, l'anticorps contrôle n'en n'est pas capable (Fig 10B).

Figures 11A à 11D : L'anticorps anti-FGFR4 40-12 est capable de réduire le développement de tumeurs pancréatiques dans un modèle murin RipTag en inhibant l'angiogenèse tumorale : Le modèle Rip1-Tag2 est un modèle murin où des souris transgéniques expriment l'antigène T du SV40 dans les cellules β des îlots du pancréas produisant l'insuline (Hanahan D. Nature, 1985, 9-15:115-22.). Cet antigène

T est exprimé au cours du développement embryonnaire du pancréas jusqu'à 4 à 5 semaines de vie, sans effet apparent. Une partie des ilots pancréatiques exprimant l'antigène T progresse alors pendant les 5 semaines suivantes vers la formation d'ilots angiogéniques associés à une activation de la vasculature puis vers le développement de petites tumeurs de type adénome. Quelques semaines plus tard quelques adénomes se développent pour former des carcinomes invasifs (Fig.11A). Ces souris Rip1-Tag2 sont traitées par voie sous-cutanée une fois par semaine entre les semaines 10 et 13 à la dose de 25 mg/kg à l'aide de l'anticorps 40-12 ou de l'anticorps contrôle. Après 13 semaines, les souris sont sacrifiées. Le volume tumoral ainsi que le nombre de tumeurs par pancréas et la densité vasculaire sont déterminés. Le traitement par l'anticorps anti-FGFR4 40-12 permet de réduire significativement le volume tumoral de 55% alors que l'anticorps témoins ne présente aucun effet (Fig. 11B). L'anticorps 40-12 permet également de réduire de 34% le nombre de tumeurs par pancréas en comparaison du témoin (Fig. 11C). Cette réduction du volume tumoral est accompagnée par une réduction de la densité vasculaire, que ce soit au niveau du nombre de vaisseaux petits, moyens ou larges (Fig. 11D).

Figure 12 : La capacité des anticorps 40-12 et 64-12 à reconnaître le domaine extracellulaire complet du FGF-R4 humain ou murin ainsi que le domaine extracellulaire du FGF-R4 amputé de son domaine D1 est mesuré par ELISA. Le clone 40-12 est capable de se lier aussi bien avec les 3 constructions de FGF-R4 alors que le clone 64-12 reconnaît moins bien la forme murine du FGF-R4.

Figure 13A à 13C : L'effet antagoniste de l'anticorps anti-FGFR4 clone 40-12 sur la liaison FGF2/FGF-R4 est mesuré par des expériences de compétition de liaison avec du FGF2 marqué à l'aide d'un AlexaFluor® 488 nm. Le clone 40-12 est capable de bloquer la liaison du FGF2 humain (Fig. 13A) , murin (Fig. 13B) et de rat (Fig. 13C) sur des cellules 300-19 murines transfectées à l'aide d'ADNc codant pour les formes humaines, murines ou de rat du récepteur FGF-R4, et ce, avec la même efficacité (3500, 4110 et 3940 ng/ml soit 23, 27 et 26 nM pour les complexes humains, murins ou de rat respectivement).

Figure 14A : Carte du plasmide pXL4794 permettant l'expression de hFGFR4_D1 : Fc

Figure 14B : Séquence en acides aminés de la protéine hFGFR4_D1 : Fc secrétée dans la lignée HEK293 transfectée avec le plasmide pXL4794

- 5 Figure 15A : Carte du plasmide pXL4796 permettant l'expression de hFGFR4_D2 : Fc

Figure 15B : Séquence en acides aminés de la protéine hFGFR4_D2 : Fc secrétée dans la lignée HEK293 transfectée avec le plasmide pXL4796

- 10 Figure 16A : Carte du plasmide pXL4799 permettant l'expression de hFGFR4_D3 : Fc.

Figure 16B : Séquence en acides aminés de la protéine hFGFR4_D3 : Fc secrétée dans la lignée HEK293 transfectée avec le plasmide pXL4799

15

EXEMPLES :

20 Exemple 1 : Mise en évidence du rôle de FGF-R4 dans le contrôle de l'angiogenèse

Afin de démontrer le rôle de FGF-R4 dans le contrôle de l'angiogenèse, des expériences d'angiogenèse *in vitro* ont été réalisées avec des cellules endothéliales humaines de type HUVEC stimulées avec plusieurs FGF. Le FGF2, ligand activateur de la plupart des récepteurs aux FGF. Le FGF19, ligand activateur spécifique de FGF-R4 et le FGF4 ligand non activateur de FGF-R4.

Pour ce faire, des gels ont été préparés en distribuant dans chaque puits de chamberslide (Biocoat Cellware collagen, Type I, 8-well culturesides : Becton dickinson 354630), 160µl de matrigel dilué au 1/6 (Growth factor reduced Matrigel : Becton dickinson 356230) dans du collagène (rat Tail collagene, type I : Becton dickinson 354236). Les gels sont maintenus pendant 1 heure à 37°C pour permettre leur polymérisation. Ensuite, les cellules endothéliales veineuses humaines (HUVEC réf : C-12200 – Promocell) ont étéensemencées à 15.10^3 cellules/puits dans 400 µl de milieu EBM (Clonetics C3121) + 2 % FBS + hEGF 10µg/ml. Ce protocole peut être adapté à des plaques 96 puits : 60µl par puits de plaques 96 puits (Biocoat collagenl

cellware, Becton Dickinson 354407). La matrice est préparée en mélangeant 1/3 de matrigel, 1mg/ml final de collagène, NaOH (0.026x le volume de collagène en µl), PBS 1x, le volume est ensuite ajusté par de l'eau. Les cellules endothéliales sont stimulées avec 1 ng/ml de FGF2 (R&D, 133-FB-025) ou 10 ng/ml de FGF4 (R&D, 5 235-F4-025) ou de FGF19 (R&D, 969-FG-025) pendant 24h à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Après 24 heures, la longueur du réseau de microtubules formés est mesurée à l'aide d'un système d'analyse d'images assisté par ordinateur (Imagenia Biocom, Courtaboeuf, France) et la longueur totale des pseudo-tubules dans chaque puits est déterminée. La moyenne de la longueur totale du réseau de microcapillaire 10 est calculée en µm pour chaque condition correspondant à la moyenne sur 6 réplicats.

La stimulation par du FGF2 ou du FGF19 permet l'induction de la formation de nouveaux tubules alors que le FGF4 n'a pas d'effet (Fig. 1A). Ces résultats montrent que l'activation spécifique de FGF-R4 permet d'induire la formation de néo-vaisseaux 15 et donc de conclure que FGF-R4 contrôle l'angiogenèse *in vitro*.

La corrélation *in vivo* avec les données *in vitro* a été obtenue à l'aide du modèle d'induction de l'angiogenèse *in vivo* dans des implants de cellulose chez la souris. Ce modèle est une adaptation du modèle décrit par Andrade *et al.* (*Microvascular* 20 *Research*, 1997, 54, 253-61).

Les animaux, souris blanches BALB/c J consanguines sont anesthésiées avec un mélange Xylazine (Rompun®, 10mg/kg)/ Kétamine (Imalgène 1000, 100mg/kg) par voie intra péritonéale. Le dos de l'animal est rasé et désinfecté à l'Héxomédine®. Une poche d'air est créée en sous cutané sur le dos de la souris par injection de 5 ml d'air 25 stérile. Une incision d'environ 2 cm, sur le haut du dos de l'animal est réalisée afin d'introduire un implant de cellulose stérile (disque de 1 cm de diamètre, 2 mm d'épaisseur, Cellspan® réf 0501) imprégné avec 50 µl de solution stérile contenant la protéine ou le produit à tester. L'incision est ensuite suturée et nettoyée à l'Héxomédine®. Les jours suivants la pose de l'implant, les souris ont reçu dans 30 l'implant la protéine ou le produit par une injection à travers la peau (50 µl/implant/jour) sous anesthésie gazeuse (Isoflurane à 5 % (Aerrane®, Baxter). Sept jours après la pose de l'éponge, les souris sont sacrifiées par une dose létale de Pentobarbital sodique (CEVA santé animale), administrée par voie intra-péritonéale. La peau est ensuite découpée, environ 1 cm autour de l'éponge en évitant la cicatrice

afin de dégager la peau et l'éponge. L'éponge est ensuite découpée en plusieurs morceaux et placée dans un tube Ribolyser® contenant 1 ml de tampon de lyse (Cell Death Detection ELISA, Roche). Les tubes sont agités 4 fois consécutives, durant 20 sec, force 4, au broyeur cellulaire (FastPrep® FP 120). Les tubes sont ensuite

5 centrifugés 10 min à 2000 g à 20°C et les surnageants sont congelés à -20°C en attendant le dosage Hémoglobine.

Le jour du dosage, les tubes sont à nouveau centrifugés après décongélation et la concentration d'hémoglobine est mesurée avec le réactif de Drabkin (Sigma, volume à volume) par lecture au spectrophotomètre à 405 nm contre une gamme étalon

10 d'hémoglobine bovine (Sigma). La concentration d'hémoglobine dans chaque échantillon est exprimée en mg/ml d'après la régression polynomiale réalisée à partir de la gamme. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ($\pm$ sem) pour chaque groupe. Les différences entre les groupes sont testées avec une ANOVA suivie d'un test de Dunnett sur la racine carrée des valeurs.

15 Dans ce modèle, le FGF19 à 50 ng par site et 5 ré-injections est capable d'induire significativement la colonisation de l'éponge par des vaisseaux matures nouvellement formés avec la même efficacité que le FGF2 à 5 ng par site. La présence de vaisseaux sanguins fonctionnels dans l'éponge est mise en évidence par la présence d'hémoglobine (Fig. 1B). Ces résultats montrent que l'activation spécifique de FGF-

20 R4 permet le recrutement de vaisseaux sanguins fonctionnels indiquant que FGF-R4 contrôle également l'angiogenèse *in vivo*.

Exemple 2 : Description des protéines FGFR utilisées comme immunogène et antigène.

25 Des récepteurs aux facteurs de croissance FGFR et en particulier leurs domaines extracellulaires des FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, FGF-R4 sont fusionnés à un tag (Histag) ou au domaine Fc d'immunoglobuline.

Le cDNA codant pour le domaine extracellulaire de FGF-R4 humain, correspond à la protéine décrite dans SwissProt FGF-R4_HUMAN position 1-365 avec la mutation

30 L136P. Il a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL4614 représenté sur la figure 2 afin d'exprimer une protéine contenant un Histag en position C-terminale dans le domaine extracellulaire.

Les protéines nommées hFGFR4-Histag, de séquence SEQ ID NO 40 ont été produites par transfection transitoire dans la lignée HEK293 EBNA (Invitrogen) à

l'aide du plasmide pXL4614 et des plasmides accessoires pXL4544 et pXL4551 permettant l'expression de deux enzymes de glycosylation des N-glycans, i.e. la α -2,3-sialyltransférase et la β -1,4-galactosyltransférase comme cela a été décrit dans la demande WO2008/065543.

5

La protéine hFGFR4-Histag exprimée dans le surnageant de culture des cellules HEK293 EBNA a été purifiée par chromatographie sur colonne sépharose Ni-chelating (Amersham Biosciences ; réf. 17-0575-01) et élution en tampon imidazole puis formulée en tampon PBS (Invitrogen ; réf. 14190-094). L'analyse de la composition en monosaccharides et la quantification des acides sialiques des N-glycans comme décrit par Saddic *et al.* 2002. (Methods Mol. Biol. 194:23-36 and Anumula *et al.* 1998. Glycobiology 8:685-694) ont permis de démontrer que la protéine était très largement sialylée (91 %). Par conséquent la protéine avait toutes les caractéristiques pour avoir des propriétés pharmacocinétiques suffisantes.

10 De façon comparable la protéine hFGFR4-Streptag (SEQ ID NO 69) a été purifiée par chromatographie sur colonne Strep-Tactin Superflow (IBA ; réf. 2-1206) et élution en tampon desthiobiotine puis formulée en tampon PBS.

La protéine hFGFR4(D2,D3)-Histag correspond à la séquence SEQ ID NO 42. Le cDNA a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4615 représenté sur la figure 3 et la protéine a été produite et purifiée dans des conditions comparables à la protéine hFGFR4-Histag.

20

Le cDNA codant pour la protéine mFGFR4-Histag (SEQ ID NO 43) a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4621 représenté sur la figure 4 et la protéine a été produite et purifiée dans des conditions comparables à la protéine hFGFR4-Histag.

25

La protéine hFGFR1-Fc, (SEQ ID NO 46) contient le domaine extracellulaire de FGF-R1 IIIc humain fusionné en C-terminal au domaine Fc de l'IgG1 humain. Le cDNA a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4728 représenté sur la figure 5 et la protéine a été produite dans des conditions comparables à la protéine hFGFR4-Histag puis purifiée par chromatographie sur colonne d'affinité Sépharose protéine G (Amersham Biosciences) et élution en tampon 100 mM glycine/HCl pH 2,7 puis formulée en tampon PBS.

30

La protéine hFGFR2-Fc, de séquence SEQ ID NO 48, contient le domaine extracellulaire de FGF-R2 IIIc humain fusionné en C-terminal au domaine Fc de l'IgG1 humain. Le cDNA a été cloné dans le plasmide d'expression eucaryote pXL4327 représentée sur la figure 6 et la protéine a été produite puis purifiée dans des conditions comparables à la protéine hFGFR1-Fc.

La protéine hFGFR3-Fc est une protéine fusionnant le domaine extracellulaire de FGF-R3 IIIc humain au domaine Fc de l'IgG1 humain a été obtenue de R&D System (réf : 760-FR).

La protéine hFGFR4-Fc est une protéine fusionnant le domaine extracellulaire de FGF-R4 humain au domaine Fc de l'IgG1 humain a été obtenue de R&D Systems (réf : 685-FR).

Différents sous-domaines de la partie extracellulaire de protéine hFGFR4 ont été fusionnés au domaine Fc de l'IgG1 humain. Le sous-domaine D1 est contenu dans la construction SABVA4794 (SEQ ID NO 112 et Fig 14A et 14B). Le sous-domaine D2 est contenu dans la construction SABVA4796 (SEQ ID NO 114 et Fig 15A et 15B). Le sous-domaine D3 est contenu dans la construction SABVA4799 (SEQ ID NO 116 et Fig 16A et 16B). Ces trois sous-domaines s'étendent respectivement des positions 1 à 179 pour SABVA4794, 1 à 32 plus 145 à 242 pour le SABVA4796 et 1 à 32 plus 228 à 360 pour le SABVA4799 (positions décrites dans SwissProt FGF-R4_HUMAN). Ces protéines ont été produites à partir des plasmides pXL4794 (séquence codante SEQ ID NO 111), pXL4796 (séquence codante SEQ ID NO 113) et pXL4799 (séquence codante SEQ ID NO 115) dans des conditions comparables à la protéine FGFR1-Fc.

Exemple 3 : Génération et criblage des anticorps monoclonaux anti-FGF-R4

A – Anticorps obtenus par immunisation

Les anticorps monoclonaux ont été obtenus par immunisation avec l'immunogène hFGFR4-Histag chez cinq souris BALB/cJ (Charles River), âgées de 6 à 8 semaines immunisées avec chacune un total de 24 µg de hFGFR4-Histag par la méthode RIMMS décrite par Kilpatrick *et al.* (1997. Hybridoma 16 : 381389) et le protocole de fusion décrit dans ClonaCell™- HY Hybridoma Cloning Kit (StemCell Technologies ; réf 03800).

Deux jours après la dernière injection, les souris ont été sacrifiées et les nodules lymphatiques ont été fusionnés avec les cellules de myélome P3X63-AG8.653 (ATCC, CRL-1580) dans un rapport 5:1 en présence de Polyéthylène Glycol (ClonaCell™-HY réf. 03806). La suspension cellulaire a été répartie aseptiquement dans des boîtes de Petri incubées à 37°C en présence de 5 % CO₂. Les colonies apparues après 12 jours d'incubation ont été isolées et mises en culture dans du milieu E (ClonaCell™-HY; ref. 03805) dans des boîtes 96 puits.

Le criblage primaire d'anticorps monoclonaux obtenus par immunisation avec hFGFR4-Histag a été réalisé par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture hFGFR4 –Streptag. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'hybridomes ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de lapin anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma ; réf. A9044-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm. Parmi les 444 hybridomes testés, 129 étaient positifs par dosage ELISA avec l'antigène hFGFR4-Streptag dont 120 hybridomes étaient aussi positifs avec la protéine dimère hFGFR4-Fc.

Un criblage secondaire a été réalisé pour sélectionner uniquement les anticorps spécifiques au FGF-R4 par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture la protéine hFGFR4-Streptag, puis avec les protéines hFGFR1-Fc, hFGFR2-Fc et hFGFR3-Fc décrites dans l'exemple 2. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'hybridomes ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de lapin anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma ; réf. A9044-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm.

Parmi les 129 hybridomes testés positifs par dosage ELISA avec l'antigène, 84 hybridomes étaient positifs avec hFGFR4-Streptag et n'avaient pas d'affinité ni pour hFGFR1-Fc, ni pour hFGFR2-Fc ni pour hFGFR3-Fc. En fonction de leur croissance et de leur morphologie, 39 hybridomes ont été conservés. Leur isotype a été déterminé à l'aide du kit SEROTEC (réf. MMT1) ; 95 % étaient des IgG1.

Un criblage tertiaire a été réalisé sur un test de prolifération de cellules modifiées Baf/3, induite par FGF2 afin de caractériser l'inhibition par les anticorps anti-FGFR4.

Les hybridomes murins exprimant les anticorps anti-FGFR4 antagonistes ont été clonés par dilution-limite. A partir des cellules d'hybridomes cultivées en phase exponentielle, la séquence codante (cDNA) a été déterminée après extraction de l'ARNm à l'aide du kit Oligotex (Qiagen ; réf 72022) ; obtention et amplification du cDNA par la méthode RACE-RT avec le kit Gene Racer, la reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen ; réf L1500) et les amorces (primers) décrites dans le tableau 2 ci-dessous ; amplification des fragments cDNA à l'aide de la polymérase Phusion (Finnzymes ; réf. F-530S), les amorces (primers) et les conditions de température décrites dans le tableau 2. Les fragments amplifiés contenant les parties codantes pour VH (partie variable de la chaîne lourde HC) ou VL (partie variable de la chaîne légère LC) ont été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy de Promega ; réf A137A), les inserts des plasmides obtenus ont été séquencés, de sorte que la séquence codante de chaque domaine variable ait été analysée dans les sens 5'-3' et 3'-5' sur au moins 6 plasmides correspondant aux anticorps anti-FGFR4 40-12 et anti-FGFR4 64-12. Les analyses de séquence, contigs et alignements ont été réalisées à l'aide du logiciel disponible sur Vector NTI (Invitrogen).

Les plasmides contenant les séquences consensus codant pour les parties variables des anticorps anti-FGFR4 ont été conservés. Le plasmide pXL4691 contient la séquence codant pour la VH de séquence SEQ ID NO 5 de l'anticorps anti-FGFR4 40-12, et le plasmide pXL4693 contient la séquence codant pour la VH de séquence SEQ ID NO 19 de l'anticorps anti-FGFR4 64-12 comme présenté dans le tableau 2 ci-dessous.

Le plasmide pXL4690 contient la séquence nucléotidique SEQ ID NO 7 codant pour la VL de séquence SEQ ID NO 8 de l'anticorps anti-FGFR4 40-12, et le plasmide pXL4692 contient la séquence nucléotidique SEQ ID NO 21 codant pour la VL de séquence SEQ ID NO 22 de l'anticorps anti-FGFR4 64-12 comme présenté dans le tableau 2 ci-dessous.

30

Tableau 2 - Conditions opératoires et analyse des réactions de transcriptase reverse et PCR -Identification des plasmides pXL4690 à pXL4693.

Anti-FGFR4	40-12	64-12
Réaction RT Température Primers	55°C SEQ ID NO 64 (HC) SEQ ID NO 65 (LC)	55°C SEQ ID NO 64 (HC) SEQ ID NO 66 & SEQ ID NO 67 LC)
Primer 5'-GeneRacer (SEQ ID NO 63)	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'	
Primer 3'- interne au hinge murin (SEQ ID NO 64)	5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA-3'	
Primer 3'- interne au Ck murin (SEQ ID NO 65)	5'-CTCATTCCTGTT GAAGCTCTT GAC-3'	
Primers 3'- internes à Cλ murin (SEQ ID NO 66 et SEQ ID NO 67)		5'- ACACTCAGCACGGG ACAAACTCTTCTC-3' 5'- ACACTCTGCAGGAG ACAGACTCTTTTC-3'
PCR de HC: Température Primers	55°C SEQ ID NO 63 - SEQ ID NO 64	55°C SEQ ID NO 63 – SEQ ID NO 64
Séquence des produits PCR clonés (VH)	9 clones ont la même séquence VH et une séquence CH1 identique à celle du mCH1-	6 clones ont la même séquence VH et une séquence CH1 identique à celle du mCH1
Plasmide contenant VH	pXL4691	pXL4693
PCR de LC : Température Primers	55°C SEQ ID NO 63 – SEQ ID NO 65	55°C SEQ ID NO 63 – SEQ ID NO 66 & 67
Séquence des produits PCR clonés (VL)	11 clones ont la même séquence VL et une séquence Ck identique à mCk	6 clones ont la même séquence VL et une séquence Cλ identique à mCλ
Plasmide contenant VL	pXL4690	pXL4692

Les séquences en acides aminés des parties variables légères et lourdes respectivement des anticorps anti-FGFR4 64-12 et anti-FGFR4 40-12 sont différentes. Les numéros des séquences utilisées, obtenues et déduites sont indiqués dans le tableau 7.

Les anticorps 40-12 et 64-12 ont été produits en flasques T500. Le surnageant de culture a été récolté après 7 jours. Les anticorps anti-FGFR4 ont été purifiés par affinité sur protéine G puis dialysés contre du PBS filtrés stériles et conservés à 4°C.

Les anticorps antagonistes purifiés ont un K_D de 6.5×10^{-9} M (anti-FGFR4 40-12) et 5.75×10^{-8} M (anti-FGFR4 64-12).

B – Anticorps sélectionné à l'aide de la méthode phage display

Le criblage primaire d'anticorps monoclonaux obtenus par phage display avec hFGFR4-Histag a été réalisé par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture hFGFR4-Histag. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-2 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'E. coli infectées par les phages ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de souris antiM13 conjugué à la peroxydase (GE Healthcare ; réf. 27-9421-01, dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf. UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm.

Un criblage secondaire a été réalisé pour sélectionner uniquement les anticorps spécifiques au FGF-R4 par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture la protéine hFGFR4-Histag, puis avec les protéines hFGFR1-Fc, hFGFR2-Fc et hFGFR3-Fc décrites dans l'exemple 2. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-2 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les surnageants de culture d'E. coli infectées par les phages ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de souris antiM13 conjugué à la peroxydase (GE Healthcare ; réf. 27-9421-01, dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf. UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm.

Les clones spécifiques au FGF-R4 sélectionnés ont été séquencés et reclés dans un vecteur d'expression pour transfection transitoire de cellules HEK293.

Pour cela, dans une première étape, les régions codant le Fab, c'est à dire la chaîne légère de l'anticorps, un site de liaison de ribosome bactérien, et la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps, sont extraites du phagemide par restriction et insérées dans un plasmide d'expression d'IgG pour cellules de mammifères, en aval d'une
5 séquence signal d'anticorps eucaryote et en amont de la région constante d'une chaîne lourde d'IgG1 humaine. Dans une seconde étape, la région contenant le site de liaison du ribosome bactérien et le peptide signal bactérien de la chaîne lourde est échangée contre une séquence IRES et une séquence signal eucaryote. Les IgG sont exprimées par transfection transitoire de cellules HEK293. Ce processus est décrit en
10 détail dans *T. Jostock et al. , Journal of Immunological Methods 289 (2004) 65–80*
Un exemple de séquence de région constante d'IgG1 humaine qui peut être utilisée dans la présente invention est la séquence SEQ ID NO 117.

Un criblage tertiaire a été réalisé sur un test de prolifération de cellules modifiées
15 Baf/3, induite par FGF2 et décrite dans l'exemple 4 afin de caractériser l'inhibition par les anticorps anti-FGFR4 en utilisant les surnageants de cultures de cellules HEK293 transfectées transitoirement par les vecteurs d'expression des anticorps. Ce criblage a permis d'identifier les anticorps des clones 8, 31, 33 et 36. Les séquences correspondantes sont décrites dans le tableau 7.

20

Exemple 4 : Etablissement de la lignée clonale murine BaF/3 FGF-R4-hMpl et protocole de prolifération cellulaire

La partie extracellulaire et transmembranaire du FGF-R4 a été clonée en fusion
25 traductionnelle avec le domaine intracellulaire du hMpl dans un vecteur pEF6/V5-His A muté afin d'obtenir la présence en 5' du tag HA devant le récepteur chimère FGF-R4-hMpl.

Construction du pEF6A muté

30 Le vecteur pEF6/V5-His A (Invitrogen, référence V961-20) a été amélioré afin d'intégrer le MCS (multi Clonage Sites) associé au tag HA placé sous le peptide signal de l'IgGk du pDisplay (Invitrogen, référence V660-20). Pour se faire, le MCS associé au tag HA et à son peptide signal ont été amplifiés par PCR entre les amorces sens de séquence SEQ ID NO : 51 et reverse de séquence SEQ ID NO : 52

permettant d'insérer les sites de restriction KpnI en 5' et XbaI en 3'. Le fragment PCR a été digéré par les enzymes KpnI et XbaI puis cloné dans le vecteur pEF6/V5-His A ouverts par les mêmes enzymes. Enfin, le premier site BamHI du MCS a été remplacé par le site BsrGI en digérant vecteur nouvellement formé par les enzymes KpnI et SpeI et en insérant entre ces sites les amorces de séquences SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 hybridées entre elles et contenant le site enzymatique BsrGI. Le vecteur obtenu a été nommé : pEF6mut-HA.

Construction du vecteur pEF6mut-HA-FGF-R4-hMpl

- 10 Le domaine intracellulaire du Mpl a été amplifié dans un vecteur pEF6/V5-His TOPO (Invitrogen, référence K9610-20) entre les amorces sens de séquence SEQ ID NO : 55 permettant l'insertion du site de digestion SacI et reverse de séquence SEQ ID NO : 56 appelée communément revBGH. Les fragments PCR générés ont ensuite été digérés par les enzymes SacI et NotI.
- 15 Le domaine extracellulaire et transmembranaire du FGF-R4 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces (sens : séquence SEQ ID NO : 57 ; reverse : séquence SEQ ID NO : 58). Ces amorces permettent l'insertion des sites enzymatiques BamHI en 5' et SacI en 3'. Le fragment PCR obtenu a alors été digéré par les enzymes BamHI et SacI.
- 20 Les amplifications d'ADN codant pour le hMpl et pour le FGF-R4 ont ensuite été clonées simultanément dans le vecteur pEF6mut-HA ouvert BamHI – NotI. La construction qui en résulte a été nommée « pEF6mut-HA FGF-R4 α IIIc-hMpl2 ». Cette construction a ensuite été améliorée par mutagenèse dirigée afin de changer le domaine transmembranaire du FGF-R4 (séquence protéique SEQ ID NO : 59) pour la
- 25 séquence SEQ ID NO : 60. Pour se faire, le kit "QuickChange® Site-directed mutagenesis kit" (Clontech, référence 200518) a été utilisé avec les amorces sens de séquence SEQ ID NO : 61 et reverse de séquence SEQ ID NO : 62. La nouvelle construction chimère obtenue a été appelée pEF6mut-HA FGF-R4 α IIIcmut-hMpl2.
- 30 Création d'une lignée stable par transfection de la lignée murine BaF/3 avec la construction FGF- R4 α IIIcmut-hMpl2:

La construction « pEF6mut-HA FGF-R4 α IIIcmut-hMpl2 » a été introduite de façon stable par électroporation dans le génome des cellules murines BaF/3. La lignée

obtenue a été sélectionnée en présence de FGF2 à 20 ng/ml (R&D, référence 234-FSE-025) et d'héparine à 100 ng/ml (Sigma, référence H3149). La lignée transfectée et sélectionnée est alors de type clonal.

5 Protocole de prolifération cellulaire avec la lignée cellulaire BaF/3 FGFR4-hMpl :

Les cellules BaF/3 FGFR4-hMpl ont été cultivées et entretenues dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen ; réf. 32404-014) complet (10 % SVF (Hyclone; réf. SH30070.03), Glutamine à 2mM, MEM Non Essential Amino Acid 1x (Gibco, réf 11140-035), MEM Sodium Pyruvate 1x (Gibco, réf 11360-039)) , supplémenté en
10 FGF2 à 20ng/ml (R&D System, ref 234-FSE) et héparine à 3ng/ml (Sigma, ref H3149).. La veille, les cellules sontensemencées à $0.4 \cdot 10^6$ cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 complet supplémenté en FGF2 à 20ng/ml et en héparine à 3ng/ml. Le lendemain, 50µl de suspension cellulaire BaF/3 FGFR4-hMpl dans du milieu RPMI 1640 complet supplémenté en FGF2 à 20ng/ml et en héparine à 3ng/ml à $0.2 \cdot 10^6$
15 cellules/ml ont été dispensés en plaque 96 puits (Porvair, réf 214006) suivi de 50µl de surnageant d'hybridome contenant l'anticorps à tester. Les plaques ont ensuite été placées à 37°C, 5 % CO₂ pendant 24 à 30 h. Pour la lecture de la prolifération cellulaire, la quantité d'ATP a été quantifiée par l'ajout de 100 µl de Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, ref G7571) et la luminescence a été lue à
20 l'aide d'un luminomètre.

Les clones présentant dans ce test un signal 50 % plus faible que celui du milieu RPMI 1640 complet contenant les additifs FGF2 à 20 ng/ml et héparine à 3 ng/ml ont été retenus.

25 Lorsque les anticorps anti-FGFR4, spécifiques de FGF-R4 ont été incubés avec les cellules Baf/3-FGFR4-hMpl et avec les additifs suivants FGF2 à 20 ng/ml et l'héparine à 3 ng/ml, un effet antagoniste sur la prolifération cellulaire a été observé. Parmi les 39 hybridomes testés, 14 sont capable d'inhiber la prolifération cellulaire, induite par le FGF, des cellules Baf/3-FGFR4-hMpl en présence de FGF2.
30 Il a été montré par ELISA (Fig 12) que les anticorps anti-FGFR4 antagonistes 40-12 et 64-12 étaient affins pour les protéines murines mFGFR4 et humaines hFGFR4 (D2, D3).

Enfin un dernier criblage a été réalisé par Surface Plasmon Resonance (BIAcore 2000) pour déterminer les constantes d'affinité des anticorps anti-FGFR4. L'interaction entre la protéine FGF-R4 et l'anticorps anti-FGFR4 présent dans le surnageant de culture de l'hybridome a été analysée après avoir fixé l'anticorps anti-FGFR4 à un anticorps anti-Fc lui-même fixé sur la chips CM. Les mesures de cinétiques sont réalisées selon le protocole de Canziani *et al* 2004. Anal. Biochem. 325 : 301-307.

Deux anticorps parmi ceux ayant des constantes d'affinité de 10^{-8} à 10^{-9} M et des vitesses de dissociation de 10^{-3} à 10^{-5} s⁻¹ ont été sélectionnés. Les caractéristiques de ces anticorps sont décrites dans le tableau 1 ci-dessous.

La méthode de référence utilisée pour la détermination du K_D est le Surface Plasmon Resonance (BIAcore).

Tableau 1A : Constantes d'affinité et d'association/dissociation des anticorps anti-FGFR4 antagonistes purifiés 40-12 et 64-12

Anti-FGFR4	k _{on} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (M)
40-12	1.94E+05	1.26E-03	6.50E-09
64-12	1.05E+04	6.02E-04	5.75E-08

Tableau 1B : Paramètres cinétiques de liaison des anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33 et 36 mesurés par Surface Plasmon Resonance (BIAcore 3000) :

	sur h-FGFR4-Histag			sur m-FGFR4-Histag		
	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	KD (M)	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	KD (M)
Clone 8	8,93E+05	2,92E-04	3,27E-10	1,20E+06	1,36E-04	1,15E-10
Clone 31	6,48E+05	9,80E-04	1,52E-09	9,14E+05	1,80E-03	1,97E-09
Clone 33	8,05E+05	6,17E-04	7,71E-10	1,01E+06	7,04E-04	6,92E-10
Clone 36	2,44E+05	6,31E-04	2,62E-09	3,30E+05	7,52E-04	2,28E-09

Exemple 5 : Spécificité des anticorps anti-FGFR4A - Spécificité de l'anticorps anti-FGFR4 40-12 pour le FGF-R4

La spécificité de chaque anticorps est établie par ELISA selon le protocole décrit dans l'exemple 4. De cette façon, on observe la capacité de chaque anticorps à se lier à chaque FGF-R. Cette expérience montre clairement que l'anticorps 40-12 ne reconnaît que FGF-R4 et est donc spécifique de FGF-R4. L'anticorps 64-12 est capable de se lier principalement à FGF-R4 mais également faiblement à FGF-R3 (Fig. 7).

B - Spécificité des anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33 et 36 pour le FGF-R4

La spécificité de chaque anticorps est établie par ELISA selon le protocole suivant : des suspensions de phages présentant à leur surface les anticorps au format Fab sont générés par infection de bactéries *E. coli*. Les antigènes de capture ont été fixés sur des boîtes Immulon-2 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Les suspensions de phages ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de souris anti-phage M13 conjugué à la peroxydase (GE Healthcare, réf. 27-9421-01, dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm. Le tableau 2 résume les résultats obtenus:

De cette façon, on observe la capacité de chaque anticorps à se lier à chaque FGF-R. Cette expérience montre clairement que les anticorps 8, 31, 33, 36 ne reconnaissent que FGF-R4 et sont donc spécifiques de FGF-R4.

Tableau 2 : Spécificité des anticorps anti-FGF-R4 issus des clones 8, 31, 33 et 36 établie par ELISA (Signal = O.D., 450 nm)

	h-FGFR4(D2,D3)-histag	h-FGFR1-Fc	h-FGFR2-Fc	h-FGFR3-Fc
Clone 8	2,55	0,05	0,00	0,00
Clone 31	2,52	0,00	0,00	0,01
Clone 33	2,73	0,00	0,00	-0,01
Clone 36	1,87	-0,01	-0,01	-0,02

Exemple 6 : Effet antagoniste de l'anticorps 40-12 et des anticorps issus des clones 8, 31, 33, 36 sur l'angiogenèse (*in vitro*)

Afin de déterminer l'activité biologique de l'anticorps monoclonal 40-12 anti-FGFR4 au cours de l'angiogenèse de cellules endothéliales humaines, des expériences d'angiogenèse *in vitro* ont été réalisées à l'aide de cellules HUVEC stimulées par du FGF2 en présence de l'anticorps 40-12 ou de l'anticorps témoins en doses croissantes de 1 à 30 µg/ml. (Fig 8A et 8B)

Dans ce cadre, l'anticorps monoclonal anti-FGFR4 antagoniste actif 40-12 est capable d'inhiber l'angiogenèse de cellules HUVEC induite par le FGF2, et ce, à la dose de 30 µg/ml ou 200 nM alors que l'anticorps témoin 64-12 n'a aucun effet. De plus, l'anticorps 40-12 n'a aucun effet propre sur l'angiogenèse basale.

Ces résultats indiquent qu'un anticorps antagoniste spécifique de FGF-R4 est capable d'inhiber l'angiogenèse.

Comme pour l'anticorps 40-12, les anticorps anti-FGFR4 des clones 8, 31, 33 et 36 issus du phage display ont été évalués quant à leur capacité d'inhiber l'angiogenèse de cellules endothéliales humaines de type HUVEC induite par le FGF-2. Ces 4 anticorps bloquent la stimulation de l'angiogenèse *in vitro* obtenue avec le FGF-2, et ce à la dose de 10 µg/ml (Fig. 8C et 8D).

Exemple 7 : Effet antagoniste de l'anticorps 40-12 et des anticorps issus des clones 8, 31, 33, 36 sur des cellules d'hépatocarcinomes humains (*in vitro*)

Afin de déterminer l'effet anti-tumoral de l'anticorps monoclonal anti-FGFR4 antagoniste 40-12, des expériences ont été réalisées sur des cellules d'hépatocarcinome humain Hep3b dont la prolifération et les voies de signalisation y aboutissant sont dépendantes du couple ligand-récepteur : FGF19/FGF-R4.

Premièrement, l'étude des voies de signalisation dépendantes de FGF-R4 et aboutissant à la prolifération des cellules Hep3b a été entreprise par Western-blot. Cette signalisation cellulaire passe par la néo-synthèse des protéines cFos et JunB ainsi que par la phosphorylation de Erk1/2 (Lin et al., *J Biol Chem.*, 2007, 14:27277-84.). Pour ce faire, 5.10^5 cellules sontensemencées en boîte 35 mm de diamètre dans 2 ml de milieu complet (DMEM, 10 % SVF, 2 mM glutamine). 24 h après, les

cellules sont mises en carence 24 h dans 1.8 ml de milieu dépourvu de sérum. Les cellules sont ensuite stimulées pendant 3 h par 200 µl de FGF19 concentré 10 fois en absence ou en présence d'anticorps anti-FGFR4 contrôle ou 40-12. Le milieu est ensuite retiré, les cellules lavées une fois par du PBS froid et lysées sur boîte pendant 5 30 min à 4°C par 75 µl de tampon RIPA supplémenté en inhibiteur de protéase. L'extrait protéique total est ensuite centrifugé 10 min à 4 °C à 13000 rpm et le surnageant analysé par la technique de Western blot. Les membranes sont ensuite incubées 2 h à température ambiante dans du TBS, tween 0.05 %, 5 % lait puis l'anticorps primaire anti-cFos (Cell Signaling Technology, réf 2250), anti-JunB (Cell 10 Signaling Technology, réf 3746) et anti-phosphoErk1/2 (Cell Signaling Technology, réf 4377) sont ajoutés au 1/1000^{ème} et incubés une nuit à 4°C sous agitation lente. La membrane est rincée trois fois par du TBS, tween 0.05 % et l'anticorps secondaire couplé à la HRP est incubé 4 h à 4°C dilué au 1/2000^{ème} dans du TBS, tween 0.05 %, 5 % lait. Les résultats de Western-blot sont alors quantifiés à l'aide d'un Chemigenius 15 (Syngene). L'intensité des bandes obtenues avec les différents anticorps sont pondérées par l'intensité des bandes obtenues avec l'anticorps anti-actine directement couplé à la HRP et utilisé au 1/3000^{ème} (Santa Cruz Biotechnology, réf Sc-8432-HRP).

Le FGF19 à 30 ng/ml induit la synthèse des protéines JunB et cFos ainsi que la 20 phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules Hep3b. Cette néo-synthèse de protéine et la phosphorylation de Erk sont inhibées complètement par l'anticorps anti-FGFR4 40-12 à 100 µg/ml alors que l'anticorps contrôle n'a aucun effet inhibiteur. Ces effets observés sur les membranes de Western-blot (Fig. 9A) sont quantifiés et les intensités des bandes de chaque membrane sont représentées sous forme de graphe 25 (Fig. 9B).

Deuxièmement, des expériences de prolifération cellulaire proprement dites ont été menées. 5000 cellules sontensemencées en plaque 96 puits dans 100 µl de milieu DMEM, 10 % SVF, 2 mM glutamine. 24 h après, les cellules sont déprivées dans un milieu de culture sans sérum pendant 24 h. Les cellules Hep3b sont ensuite stimulées 30 72 h par 100 µl de milieu sans sérum supplémenté par 10 ng/ml de FGF19 (production interne à Sanofi-Aventis R&D) ou par 10 % sérum en absence ou en présence d'anticorps témoins ou d'anticorps monoclonal anti-FGFR4 antagoniste 40-12. Après 3 jours, la prolifération cellulaire est quantifiée à l'aide du kit CellTiter Glo (Promega, France).

De ces expériences, il en ressort que le sérum ainsi que le FGF19 sont capables de stimuler la prolifération des Hep3b. L'anticorps anti-FGFR4 antagoniste 40-12 inhibe partiellement à 100 µg/ml cette prolifération induite au sérum alors que l'anticorps témoin ne présente pas d'activité inhibitrice (Fig. 10A). De plus, l'anticorps 40-12 à 10 µg/ml bloque complètement la prolifération induite par le FGF19 (Fig. 10B). L'anticorps témoin n'a pas d'effet.

Ceci démontre que l'anti-FGFR4 antagoniste objet de l'invention peut être utilisé comme agent thérapeutique anti-tumoral dans la cadre de tumeurs dépendantes du FGF19 ou du FGF-R4 et que cet anticorps serait particulièrement efficace dans le traitement des hépatocarcinomes.

Afin de simplifier l'étude de l'effet des anticorps anti-FGFR4 sur les cellules Hep3b, un test ELISA a été mis au point pour la détection de la phosphorylation de Erk1/2 suite à la stimulation de ces cellules par du FGF-19 (en corrélation avec les expériences décrites dans l'exemple 8), du FGF-2 ou du sérum de veau fœtal.

Pour ce faire, 50 000 cellules Hep3b sont ensemencées en plaque 96 puits noires fond transparent (COSTAR, ref 3603) dans 100µl de milieu DMEM, 10% SVF, 2mM glutamine. Après 24h, les cellules sont mises en carence pendant 24h dans du milieu DMEM, 2mM glutamine sans SVF. Le milieu est ensuite aspiré et remplacé par 100µl de milieu de carence pré-équilibré à 37°C contenant le FGF ou le SVF, ainsi que les anticorps évalués aux différentes doses. Les cellules sont incubées 3h à 37°C, 5% CO₂. Le milieu de stimulation est alors aspiré, les puits sont rincés par du PBS à 4°C et les cellules sont fixées par ajout de 200µl de PFA (paraformaldéhyde) 4% dans du PBS pendant 15min à température ambiante. Le PFA est retiré et les cellules lavées trois fois par 200µl de PBS. Le marquage par des anticorps pour la détection de phospho-Erk1/2 directement sur les cellules Hep3b commence par la saturation des sites non spécifiques avec 100µl de tampon de saturation (21.25ml de PBS, 1.25ml de sérum non immun de chèvre à 10% (Zymed, ref 50-062Z), 75µl de triton X100) pendant 2h. Le tampon de saturation est remplacé par 50µl d'anticorps primaire anti-phospho Erk1/2 (Cell Signaling Technology, ref 4377) dilué au 1/100^{ème} dans du tampon PBS, 1% BSA, 0.3% triton X100. L'anticorps primaire est incubé avec les cellules une nuit à 4°C. Il est ensuite rincé par 3 lavages de 200µl de PBS et révélé à l'aide d'un anticorps secondaire anti-rabbit couplé à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes, ref A11008) dilué au 1/5000^{ème} dans du tampon PBS, 1% BSA, 0.3% triton

X100 pendant 4h. L'anticorps secondaire est ensuite rincé par 3 lavages de 200µl de PBS et 100µl de PBS est alors ajouté à chaque puits. La fluorescence est lue par-dessus à l'aide d'un lecteur de plaque de type EnVision 2103 Multilabel Reader (Perkin Elmer) en utilisant le filtre FITC.

- 5 Cette technique permet de confirmer que le FGF-19 à 30ng/ml induit la phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules Hep3b et que le 40-12 est capable de bloquer cette stimulation dès la dose de 3 µg/ml (Fig. 9C). Le FGF-2 ainsi que le sérum sont également capable d'induire le système. Dans ces 2 derniers, l'anticorps 40-12 inhibe l'effet du FGF-2 et du sérum à des doses plus élevées (30-100µg/ml ;
10 Fig. 9C).

La détection de phospho-Erk1/2 par ELISA à aussi permis de montrer que des anticorps anti-FGFR4 actifs dans le modèle de l'angiogenèse *in vitro* sont également capables de bloquer entre 70 et 95% de la phosphorylation de Erk1/2 induite par le FGF-19 à la dose de 3µg/ml (Fig. 9D).

15

De manière avantageuse, les anticorps de la présente invention ont un effet antagoniste à la fois sur l'angiogenèse pathologique associée au développement de la tumeur et sur la croissance tumorale hépatique proprement dit, en particulier sur un modèle d'hépatocarcinome.

20

Exemple 8 : Effet antagoniste de l'anticorps 40-12 dans le modèle murin de cancer pancréatique

- Pour ce modèle pharmacologique, des souris femelles Rip1-Tag2 (Charles River
25 Laboratory, France) de fond génétique C57Bl/6J sont utilisées. Les animaux ont à partir de la semaine 9 après naissance de l'eau de boisson supplémentée par 5% de saccharose. Les souris sont traitées de la semaine 10 à la semaine 12.5 dans un protocole de traitement en intervention, une fois par semaine par une injection par voie sous-cutanée des anticorps anti-FGFR4 40-12 ou contrôle à la dose de 25 mg/kg
30 (Fig. 14A). Ce protocole est approuvé par le « Comité expérimentation Animale (Animal Care and Use Committee) » de Sanofi-Aventis Recherche. Nos installations zootechniques, l'attention prêtée aux animaux ainsi que les protocoles de traitement sont en accord avec les principes imposés par la convention européenne sur la

protection des animaux Vertébrés et euthanasiés après la période de traitement ou lorsque la charge tumorale et/ou les effets secondaires oblige leur retrait de l'étude.

Pour la mesure de la charge tumorale, les animaux sont euthanasiés à la fin de l'expérience et les tumeurs sont micro-disséquées à partir de pancréas fraîchement excisés. Le volume tumoral en mm^3 est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse en appliquant la formule $[\text{volume} = 0.52 \times (\text{largeur})^2 \times (\text{longueur})]$ afin de se rapprocher du volume d'un sphéroïde. La charge tumorale par souris est calculée par le cumul du volume des tumeurs de chaque souris.

Pour l'analyse histochimique de la densité vasculaire, les animaux sont anesthésiés, les pancréas collectés, fixés une nuit dans de l'accustain® (Sigma) puis enchâssés dans de la paraffine. Des coupes de 5 μm d'épaisseur sont préparées pour chaque échantillon. Les cellules endothéliales sont détectées par l'incubation des coupes avec de la trypsine (Zymed, ref 00-3003) à 37°C pendant 10 min, puis avec un anticorps anti-CD31 de souris fait chez le rat et dilué au 1/50^{ème} (BD Pharmingen). Pour révéler les régions marquées par l'anticorps, les coupes sont incubées avec un anticorps anti-rat couplé à la biotine pendant 30 min, puis avec de la streptavidine couplé à la HRP pendant également 30 min (Vectastain® ABC kit, Vector), et enfin avec du DAB pendant 5 min (Vector, ref SK4100). Les coupes sont alors marquées avec de l'hématoxylin diluée au 1/10^{ème} (Dako, S-3309). Les prises de vue sont réalisées à l'aide d'une caméra montée sur un microscope (Nikon, E-800) à un grossissement total de 200 fois. Les images sont analysées par un logiciel (Visiolab, Biocom). Les vaisseaux sanguins dans la tumeur sont comptés et classés en fonction de leur surface : les petits vaisseaux entre 5 et 20 μm^2 , les moyens entre 21 et 100 μm^2 et les gros à partir de 101 μm^2 . Deux porte-objets par pancréas sont analysés afin de déterminer la densité vasculaire correspondant au nombre total d'éléments marqués par champ.

Dans ce modèle, le traitement sous-cutané à l'aide de l'anticorps anti-FGFR4 40-12 à 25 mg/kg une fois par semaine entre les dixième et douzième semaines, permet de réduire la charge tumorale de 55% et de façon significative (Fig11B) et à tendance à réduire de 34% le nombre de tumeurs par pancréas (Fig. 11C) alors que le traitement contrôle n'a aucun effet. Cette inhibition du développement tumoral grâce à l'anticorps anti-FGFR4 40-12 est accompagnée par une réduction significative de 31% de la densité vasculaire totale (Fig. 11D) correspondant à une réduction observée du

nombre de vaisseaux sanguins dans l'ensemble des groupes de taille de vaisseaux marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD31 (Fig. 11D).

Ces résultats *in vivo* montrent clairement qu'un anticorps anti-FGFR4 antagoniste est capable d'inhiber le recrutement et la formation des vaisseaux sanguins dans la tumeur. Cette inhibition de la vascularisation tumorale s'accompagne d'une réduction du nombre de tumeurs par pancréas et du volume tumoral total.

De manière avantageuse, les anticorps de la présente invention ont un effet antagoniste à la fois sur l'angiogenèse pathologique et sur la croissance tumorale hépatique (sur un modèle d'hépatocarcinome) et pancréatique.

Exemple 9 : Réactivité croisée de l'anticorps envers les FGF-R4 humain, murin et de rat.

Dans un premier temps, des expériences de compétition de liaison ont été réalisées. Pour ce faire, du FGF2 a été marqué au niveau des 2 cystéines libres à l'aide d'un AlexaFluor® 488 nm C-5 maléimide (Molecular Probes, A10254) selon les recommandations du fournisseur. Ce FGF2-AF488 à 10 ng/ml est capable de se lier sur les FGF-R4 humains exprimés à la surface de cellules 300-19 transfectées (Fig. 8). Cette liaison est spécifique puisque l'ajout en excès de FGF2 non marqué permet de déplacer l'interaction FGF2/FGF-R4 (Fig. 8A). La même expérience a été réalisée en rajoutant des doses croissantes de l'anticorps 40-12 ou de l'anticorps témoins 64-12. Seul l'anticorps antagoniste 40-12 est apte à déplacer la liaison FGF2-AF488/FGF-R4, et ce, avec une IC₅₀ de 3500 ng/ml soit 23 nM montrant que l'effet antagoniste de cet anticorps serait dû à sa capacité de déplacer la liaison FGF/FGF-R4.

Dans un second temps et dans le but de déterminer l'aptitude du clone 40-12 à bloquer la liaison FGF/FGF-R4 chez d'autres espèces que l'Homme, une expérience de dissociation a été réalisée en utilisant les couples FGF2/FGF-R4 de souris, de rat et humain en référence. Pour ce faire, du FGF2 murin (R&D, réf 3139-FB-025) ou de rat (R&D, réf 3339-FB-025) a été marqué de la même façon que le FGF2 humain par un AlexaFluor 488. Les expériences de dissociation ont été réalisées en utilisant les lignées 300-19 transfectées avec les récepteurs FGF-R4 de souris ou de rat. Les résultats montrent que l'anticorps anti-FGFR4 antagoniste 40-12 est capable de

dissocier la liaison FGF2/FGF-R4 dans un système souris ou rat avec la même efficacité que dans le système humain. En effet, les IC_{50} sont de 3500, 4110 et 3940 ng/ml soit 23, 27 et 26 nM pour les complexes FGF2/FGF-R4 humain, murin ou de rat respectivement (Fig. 13A, 13B et 13C respectivement). Cette capacité à se lier au FGF-R4 de rongeurs a été vérifié par ELISA. L'anticorps 40-12 se lie aussi bien au FGF-R4 humain et murin (Fig. 12).

Ces résultats indiquent que l'anticorps anti-FGFR4 40-12 pourra être utilisé dans des modèles pharmacologiques sur rongeurs (au moins souris et rat) et que les résultats obtenus devraient être prédictifs de l'efficacité chez l'Homme.

10

De même, des études menées sur les anticorps issus des clones 8, 31, 33 et 36 montrent que ces anticorps reconnaissent à la fois le FGF-R4 humain et le FGF-R4 murin (Tableau 4 ci-dessous)

15 Tableau 4 : Paramètres cinétiques de liaison des anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33 et 36 mesurés par Surface Plasmon Resonance (BIAcore 3000) :

	sur h-FGFR4-Histag			sur m-FGFR4-Histag		
	Kon ($M^{-1}s^{-1}$)	Koff (s^{-1})	KD (M)	Kon ($M^{-1}s^{-1}$)	Koff (s^{-1})	KD (M)
Clone 8	8,93E+05	2,92E-04	3,27E-10	1,20E+06	1,36E-04	1,15E-10
Clone 31	6,48E+05	9,80E-04	1,52E-09	9,14E+05	1,80E-03	1,97E-09
Clone 33	8,05E+05	6,17E-04	7,71E-10	1,01E+06	7,04E-04	6,92E-10
Clone 36	2,44E+05	6,31E-04	2,62E-09	3,30E+05	7,52E-04	2,28E-09

Example 10 : Détermination de l'épitope reconnu par les anticorps anti-FGF-R4

20

A- Détermination de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-FGFR4 40-12

Un criblage a été réalisé pour déterminer le domaine spécifique du FGFR4 reconnu par l'anticorps 40-12 par dosage ELISA. Grâce à l'utilisation d'une forme délétée du domaine D1 de FGF-R4 en ELISA, il a été établi que l'anticorps 40-12 interagissait au niveau des domaines D2-D3 de FGF-R4 (Fig. 12).

25

Un second criblage a été réalisé par dosage ELISA, en utilisant comme antigène de capture les construits contenant soit le domaine D1 (SABVA4794) ou le domaine D2 (SABVA4796) ou le domaine D3 (SABVA4799) de protéine hFGFR4 comme décrits dans l'exemple 2. L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). L'hybridome 40-12 a ensuite été ajouté puis détecté grâce à l'anticorps de lapin anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma ; réf. A9044-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm. Le tableau 5 résume les résultats obtenus:

Tableau 5 : Mesure de la liaison de l'anticorps 40-12 aux différents sous-domaines de FGF-R4

Domaine étudié	D1 SABVA4794	D2 SABVA4796	D3 SABVA4799	D1-D3 FGFR4 -Fc
Signal (O.D., 450 nm)	0.185	3.000	0.105	3.000

L'anticorps anti-FGFR4 reconnaît donc le domaine D2 de la partie extracellulaire de la protéine FGFR4.

D'autre part, la protéine FGFR4-Fc dénaturée avec du SDS n'est pas reconnue par l'anticorps 40-12 en analyse par Western Blot, ce qui indique que l'épitope ciblé par le 40-12 sur le domaine D2 de FGFR4 est de type conformationnel.

B- Détermination de l'épitope reconnu par les anticorps anti-FGFR4 8, 31, 33, 36.

Un criblage a été réalisé pour déterminer le domaine spécifique du FGFR4 reconnu par les anticorps 8, 31, 33, 36 par dosage ELISA en utilisant comme antigène de capture les construits contenant soit les domaines D2 et D3 (SEQ ID NO 42) soit la protéine hFGFR4-Histag (SABVA4614, SEQ ID NO 40). L'antigène de capture a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Des surnageants de cultures de HEK293 transfectées transitoirement par des plasmides permettant la sécrétion des anticorps 8, 31, 33, 36 ont ensuite été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de lapin anti-humain IgG conjugué à la peroxydase (DakoCytomation, réf. P0214-dilution au 1:5000). La révélation a été réalisée avec le

substrat TMB-H₂O₂ (Interchim ; réf UP664780) et les mesures de densité optique (O.D.) effectuées à 450 nm. Le tableau 6 ci-dessous résume les résultats obtenus:

Tableau 6 : Liaison des anticorps issus des clones 8, 31, 33 et 36 au FGF-R4 entier
5 ou au sous-domaine D2-D3 (signal OD à 450nm)

	hFGFR4-Histag	hFGFR4(D2,D3)-Histag
Clone 8	3,898	3,860
Clone 31	3,859	3,741
Clone 33	3,752	3,621
Clone 36	3,751	3,616

Les anticorps 8, 31, 33 et 36 reconnaissent donc le domaine D2-D3 de la partie extracellulaire de la protéine FGFR4.

10

Tableau 7 : séquences utilisées, obtenues et déduites

	Séquences nucléotidiques	Séquences protéiques
Anticorps 40-12		
VH + CH	SEQ ID NO 1	SEQ ID NO 2
VL + CL	SEQ ID NO 3	SEQ ID NO 4
VH	SEQ ID NO 5	SEQ ID NO 6
VL	SEQ ID NO 7	SEQ ID NO 8
CDR VH		SEQ ID NO 9 ; 10 ; 11
CDR VL		SEQ ID NO 12 ; 13 ; 14
Anticorps 64-12		
VH + CH	SEQ ID NO 15	SEQ ID NO 16
VL + CL	SEQ ID NO 17	SEQ ID NO 18

VH	SEQ ID NO 19	SEQ ID NO 20
VL	SEQ ID NO 21	SEQ ID NO 22
CDR VH		SEQ ID NO 23 ; 24 ; 25
CDR VL		SEQ ID NO 26 ; 27 ; 28
Séquences humanisées		
Chaîne légère 1	SEQ ID NO 29	SEQ ID NO 30
Chaîne légère 2	SEQ ID NO 31	SEQ ID NO 32
Chaîne lourde 1	SEQ ID NO 33	SEQ ID NO 34
Chaîne lourde 2	SEQ ID NO 35	SEQ ID NO 36
Chaîne lourde 3	SEQ ID NO 37	SEQ ID NO 38
Constructions		
hFGFR4-Histag	SEQ ID NO 39	SEQ ID NO 40
hFGFR4-Streptag	SEQ ID NO 68	SEQ ID NO 69
hFGFR4(D2D3)-Histag	SEQ ID NO 41	SEQ ID NO 42
mFGFR4-Histag	SEQ ID NO 43	SEQ ID NO 44
hFGFR1-Fc	SEQ ID NO 45	SEQ ID NO 46
hFGFR2-Fc	SEQ ID NO 47	SEQ ID NO 48
rFGFR4	SEQ ID NO 49	SEQ ID NO 50
Séquences amorces pour établissement lignée clonale (exemple 4)	SEQ ID NO 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55 ; 56 ; 58 SEQ ID NO 61 ; 62	
Domaine transmembranaire FGFR4		SEQ ID NO 59 ; 60
Oligonucléotides amorces tableau 1	SEQ ID NO 63 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67	
Epitope dans domaine D2		SEQ ID NO 70

Anticorps clone 8		
Chaîne légère entière	SEQ ID NO 71	SEQ ID NO 72
Chaîne légère CDR		SEQ ID NO 73 ; 74 ; 75
Chaîne lourde entière	SEQ ID NO 76	SEQ ID NO 77
Chaîne lourde CDR		SEQ ID NO 78 ; 79; 80
Anticorps clone 31		
Chaîne légère entière	SEQ ID NO 81	SEQ ID NO 82
Chaîne légère CDR		SEQ ID NO 83 ; 84 ; 85
Chaîne lourde entière	SEQ ID NO 86	SEQ ID NO 87
Chaîne lourde CDR		SEQ ID NO 88 ; 89 ; 90
Anticorps clone 33		
Chaîne légère entière	SEQ ID NO 91	SEQ ID NO 92
Chaîne légère CDR		SEQ ID NO 93 ; 94 ; 95
Chaîne lourde entière	SEQ ID NO 96	SEQ ID NO 97
Chaîne lourde CDR		SEQ ID NO 98 ; 99 ; 100
Anticorps clone 36		
Chaîne légère entière	SEQ ID NO 101	SEQ ID NO 102
Chaîne légère CDR		SEQ ID NO 103 ; 104 ; 105
Chaîne lourde entière	SEQ ID NO 106	SEQ ID NO 107
Chaîne lourde CDR		SEQ ID NO 108 ; 109 ; 110
Sous-domaines de la partie extracellulaire de hFGFR4 fusionnés au domaine Fc de l'IgG1		
fGFGR4_D1::Fc	SEQ ID NO 111	SEQ ID NO 112
fGFGR4_D2::Fc	SEQ ID NO 113	SEQ ID NO 114
fGFGR4_D3::Fc	SEQ ID NO 115	SEQ ID NO 116
Séquence de région constante d'IgG1 humaine		SEQ ID NO 117

Revendications

1. Antagoniste du récepteur FGF-R4, caractérisé en ce qu'il est un anticorps qui se lie spécifiquement à FGF-R4
2. Antagoniste selon l'une des revendications 1, caractérisé en ce qu'il se lie au domaine D2-D3 du récepteur FGF-R4.
3. Anticorps selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il se lie au domaine D2 du récepteur FGF-R4.
4. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il a un K_D vis à vis du récepteur FGF-R4 déterminé par la technique Surface Plasmon Resonance (Biacore) inférieur à $10E-8$ M.
5. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est actif à la fois contre FGF-R4 humain et FGF-R4 murin.
6. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps et comprend au moins un CDR présentant une séquence identique à l'une des séquences SEQ ID NO : 9, 10, 11, 12, 13, 14, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 108, 109 ou 110.
7. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps et comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 9, 10, 11, 12, 13 et 14 ; ou 73, 74, 75, 78, 79 et 80 ; ou 83, 84, 85, 88, 89 et 90 ; ou 93, 94, 95, 98, 99 et 100 ; ou 103, 104, 105, 108, 109 et 110, où l'un des CDR peut différer de un à deux acides aminés par rapport à l'une au moins des séquences citées ci-dessus, pour autant que l'anticorps garde sa spécificité de liaison.

8. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps dont la partie variable de sa chaîne lourde comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 5, 76, 86, 96 ou 106.
- 5
9. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps dont la partie variable de sa chaîne légère comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7, 71, 81, 91 ou 101.
- 10
10. Antagoniste selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps et en ce que sa séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 2 et 4 ; ou 6 et 8 ; ou 72 et 77 ; ou 82 et 87 ; ou 92 et 97 ; ou 102 et 107.
- 15
11. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une inhibition des voies de signalisation cellulaire contrôlées par FGF-R4..
- 20
12. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une inhibition de l'angiogenèse.
13. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale.
- 25
14. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que son affinité pour FGF-R4 est 10 fois supérieure à son affinité pour les autres récepteurs à FGF.
- 30
15. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est un anticorps humanisé.
16. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est un anticorps humain.

17. Antagoniste selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne variable légère présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences polypeptidiques SEQ ID NO 30 ou 32.
- 5
18. Antagoniste selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne variable lourde présentant au moins 80% d'identité avec une séquence SEQ ID NO 34, 36 ou 38.
- 10
19. Antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est un anticorps et en ce qu'il est conjugué à un agent cytotoxique.
20. Utilisation d'un antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement des maladies associées à une angiogenèse pathologique.
- 15
21. Utilisation d'un antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement des hépatocarcinomes ou de tout autre type de cancer hépatique.
- 20
22. Utilisation d'un antagoniste selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement du cancer du pancréas.
23. Composition pharmaceutique comprenant un antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 et des excipients.
- 25
24. Méthode de traitement d'une maladie liée à une angiogenèse pathologique caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration au patient d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.
- 30
25. Méthode de traitement d'un cancer caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration au patient d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

- 26.** Lignée cellulaire produisant des anticorps selon la revendication 1 à 19.
- 27.** Procédé de production d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une lignée cellulaire selon la revendication 26.
- 28.** Médicament comprenant un antagoniste selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.
- 29.** Polynucléotide codant pour un polypeptide présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NOS : 2, 4, 6, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 30, 32, 34, 36, 38, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 107, 108, 109 ou 110.
- 30.** Polynucléotide caractérisé en ce qu'il présente une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NOS : 1, 3, 5, 7, 29, 31, 33, 35, ou 37, 71, 76, 81, 86, 91, 96, 101 ou 106.
- 31.** Vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 29 et 30.
- 32.** Cellule hôte comprenant un vecteur selon la revendication 31.

1/22

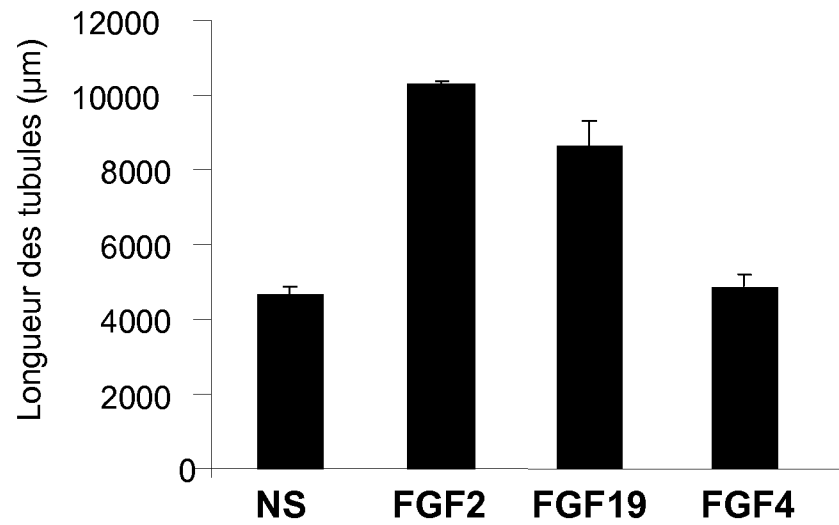


Figure 1A

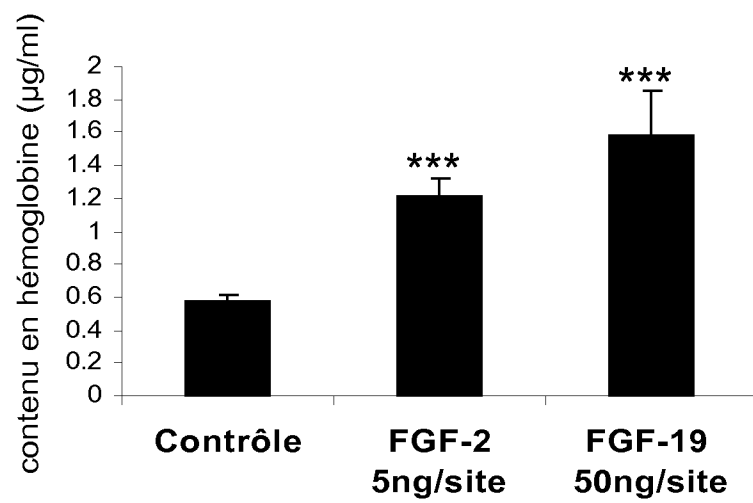


Figure 1B

2/22

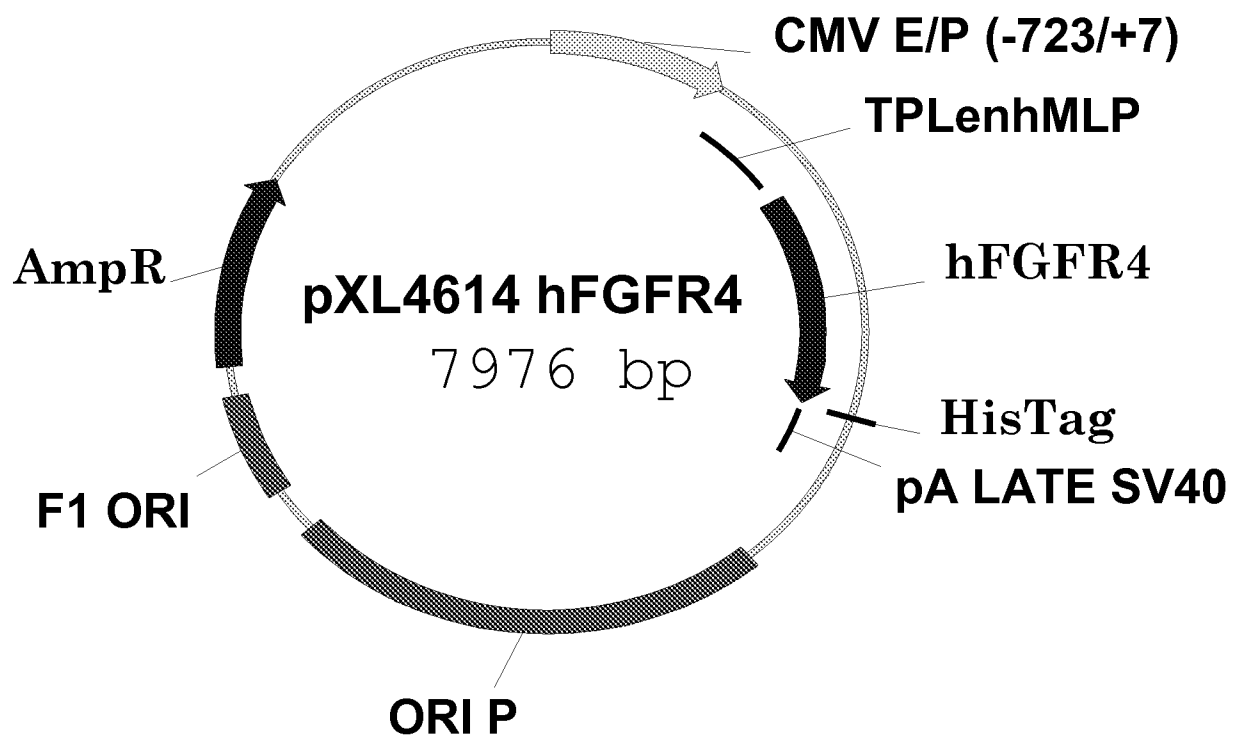


Figure 2A

3/22

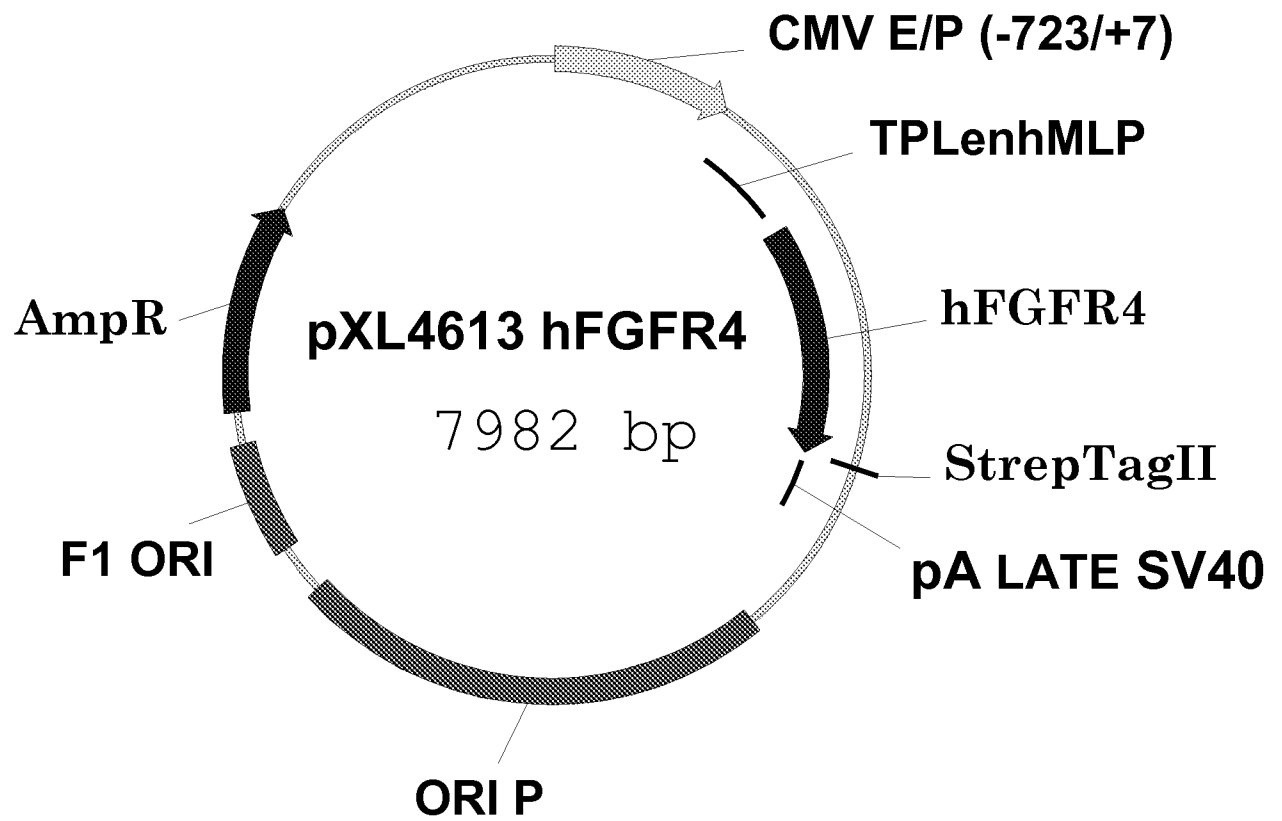


Figure 2B

4/22

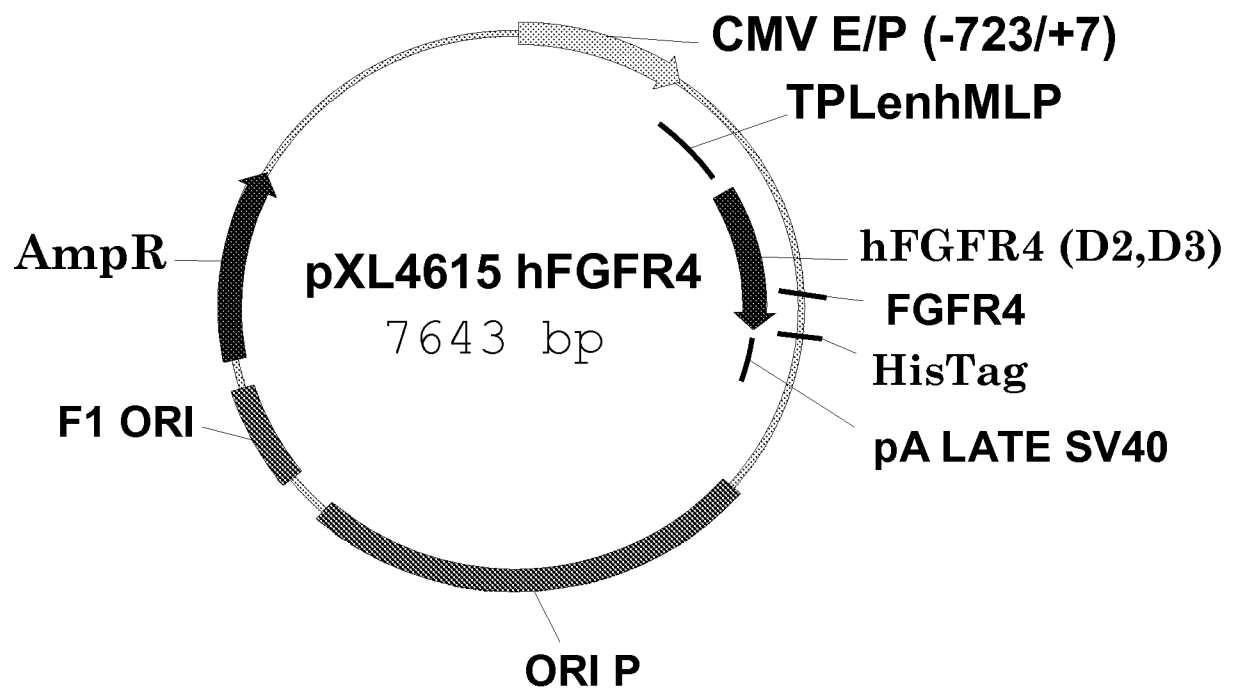


Figure 3

5/22

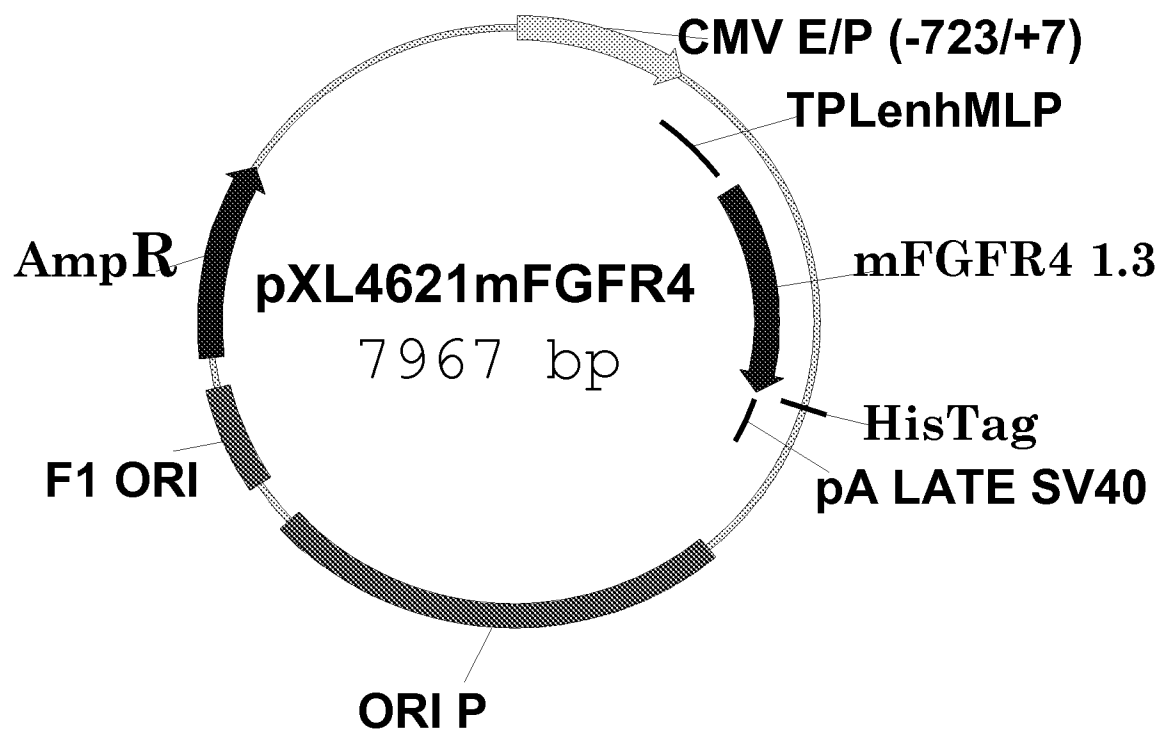


Figure 4

6/22

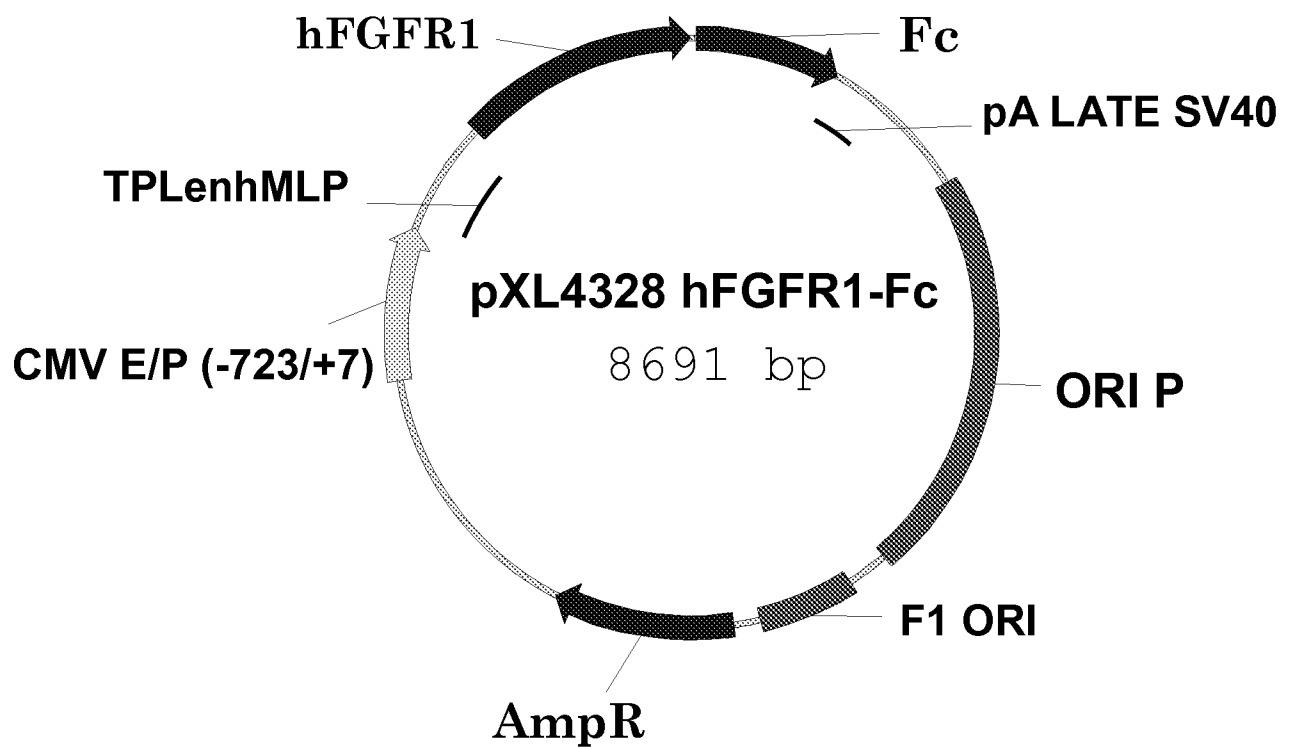


Figure 5

7/22

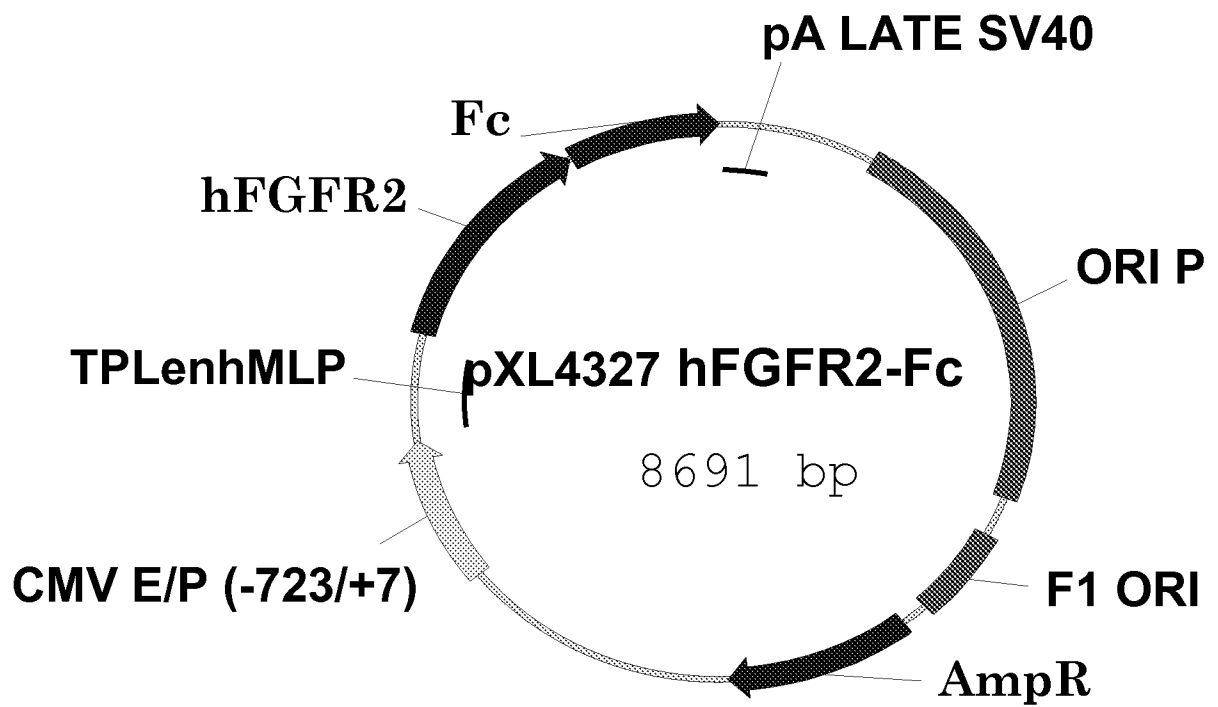
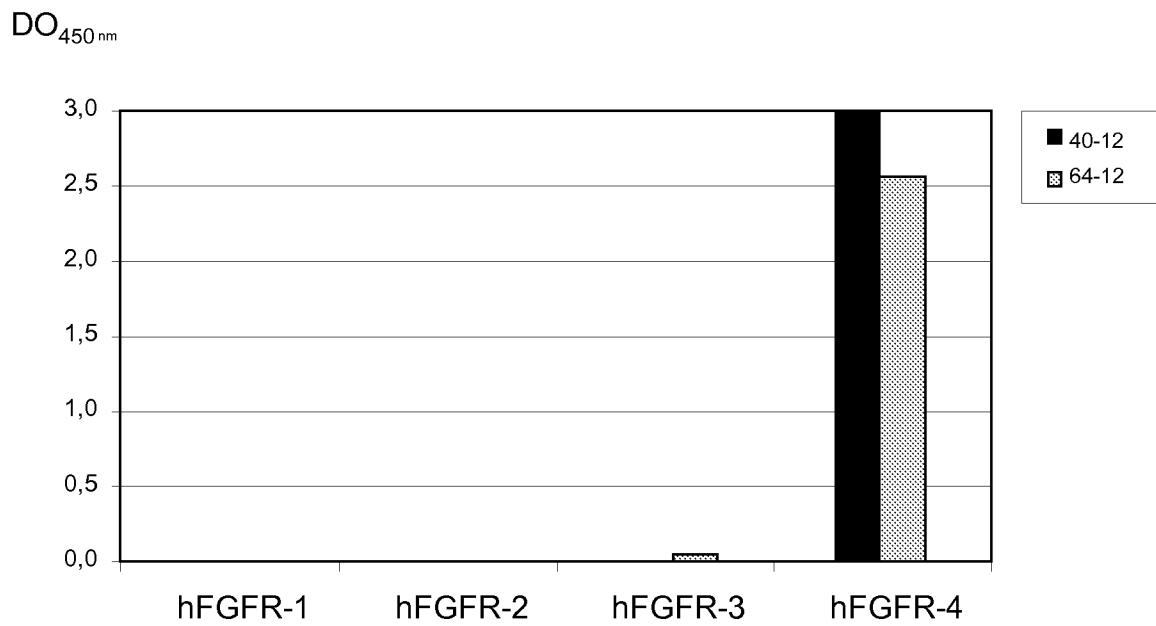


Figure 6

8/22

**Figure 7**

9/22

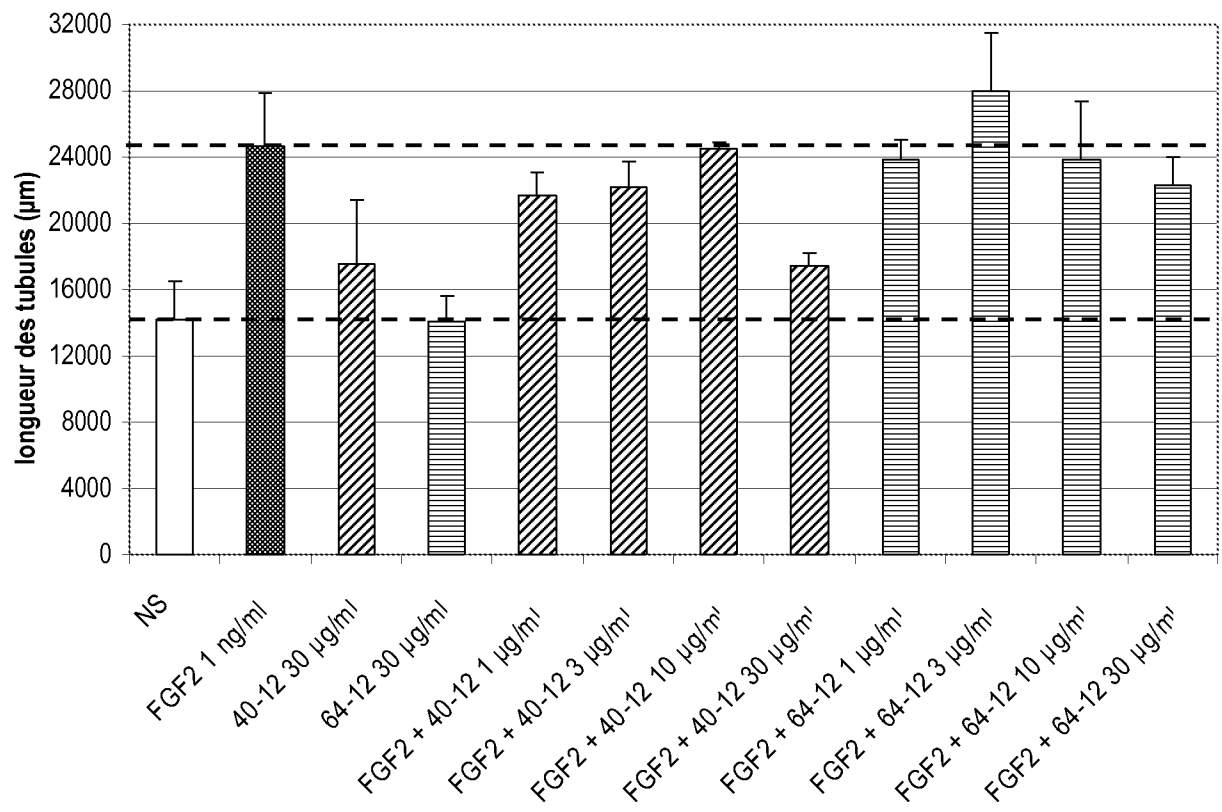


Figure 8A

10/22

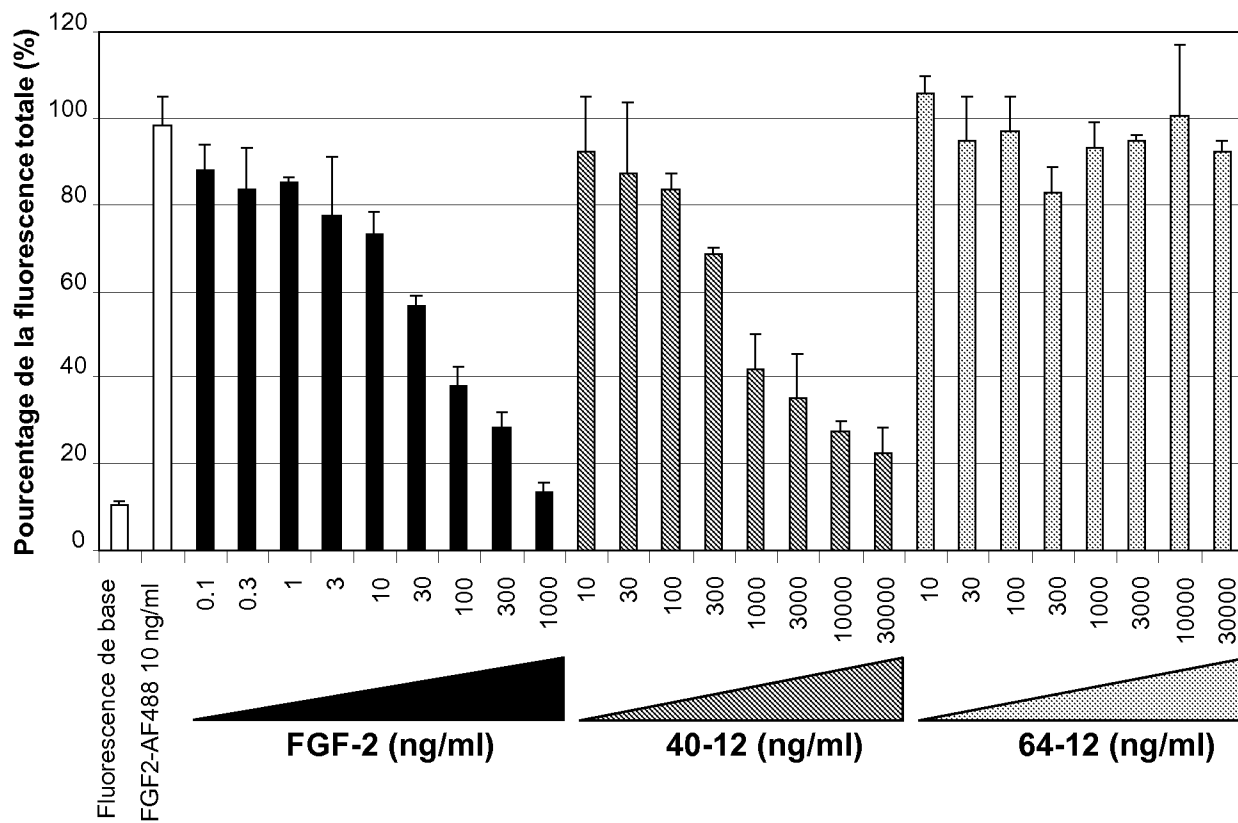


Figure 8B

11/22

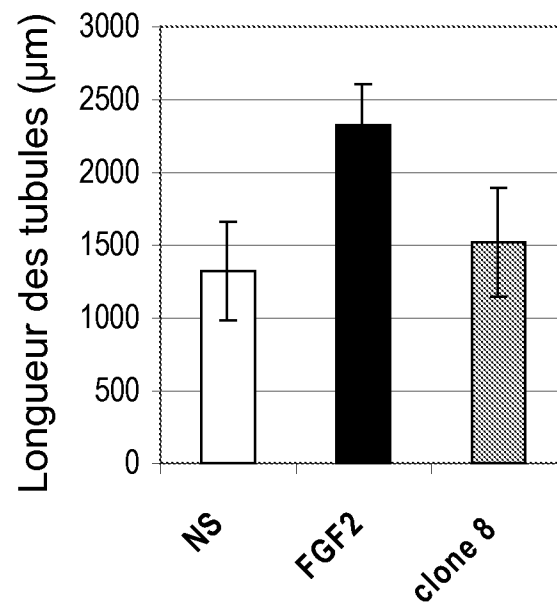


Figure 8C

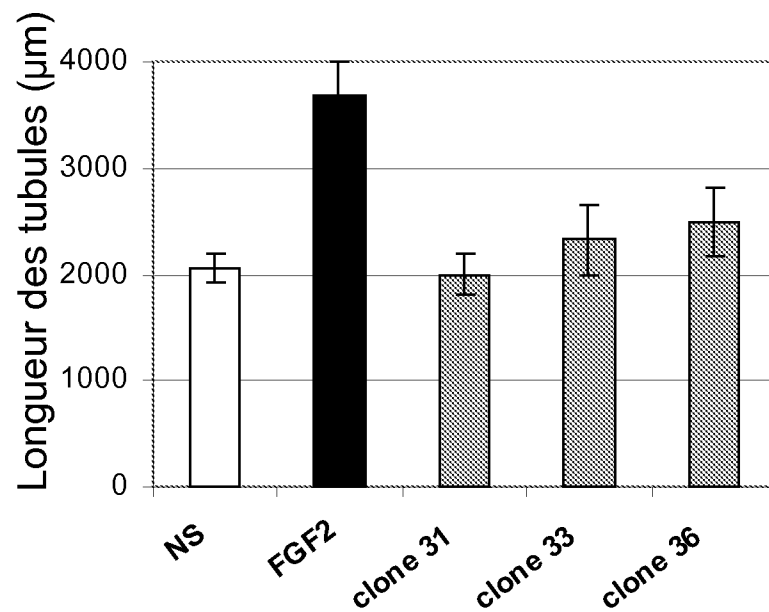


Figure 8D

12/22

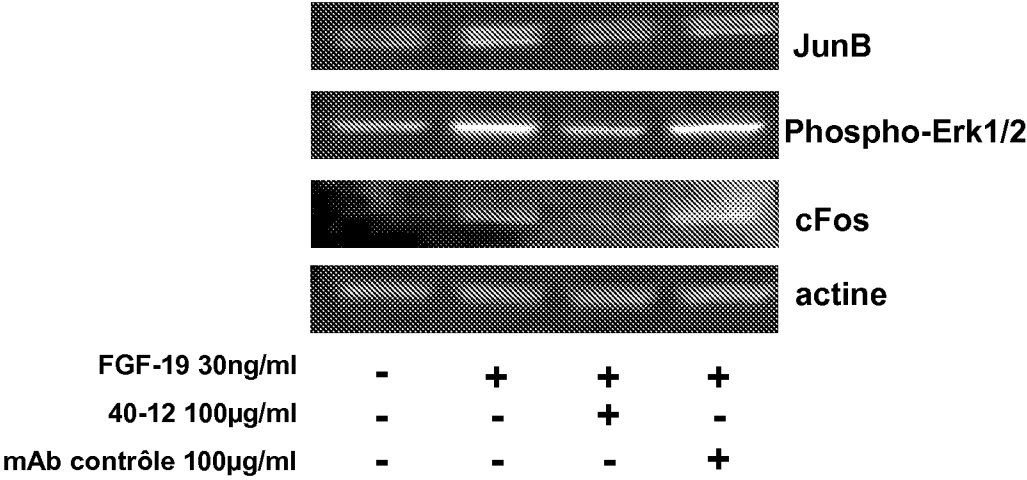


Figure 9A

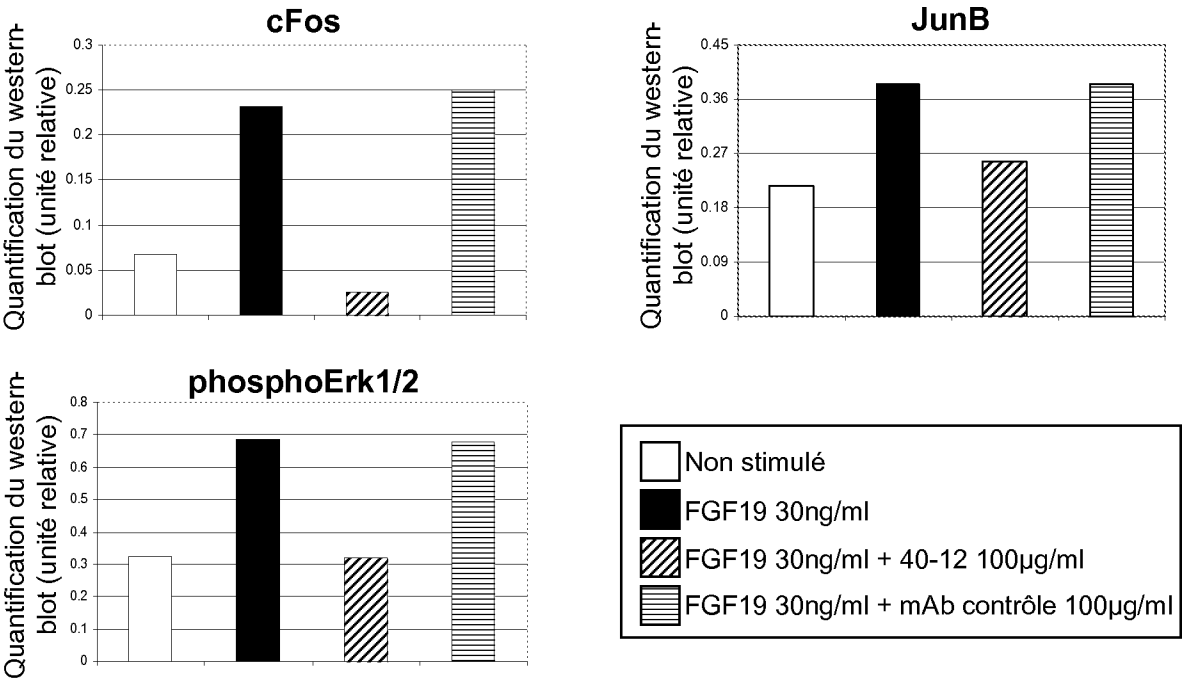


Figure 9B

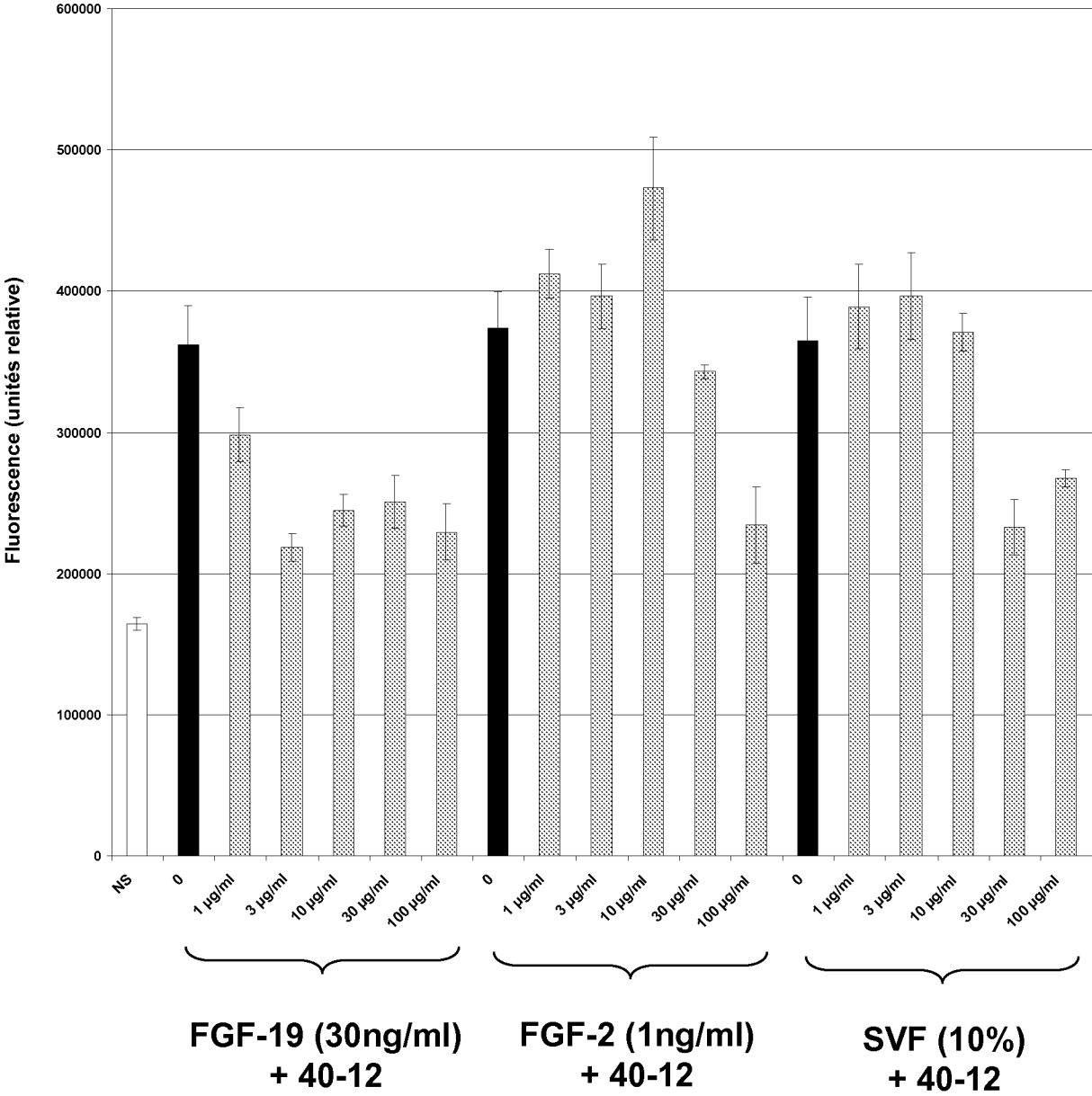


Figure 9C

14/22

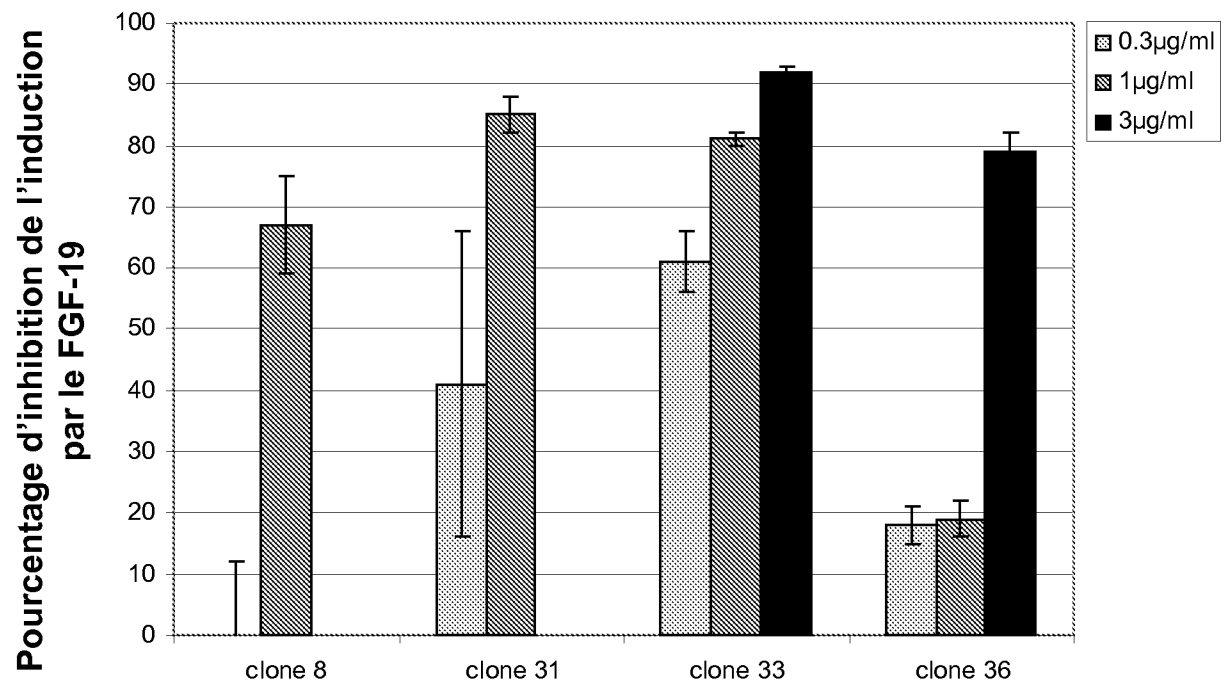


Figure 9D

15/22

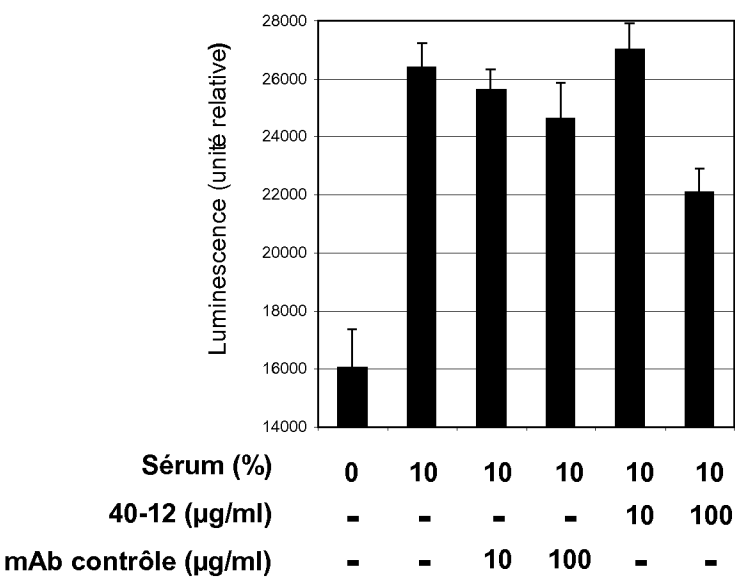


Figure 10A

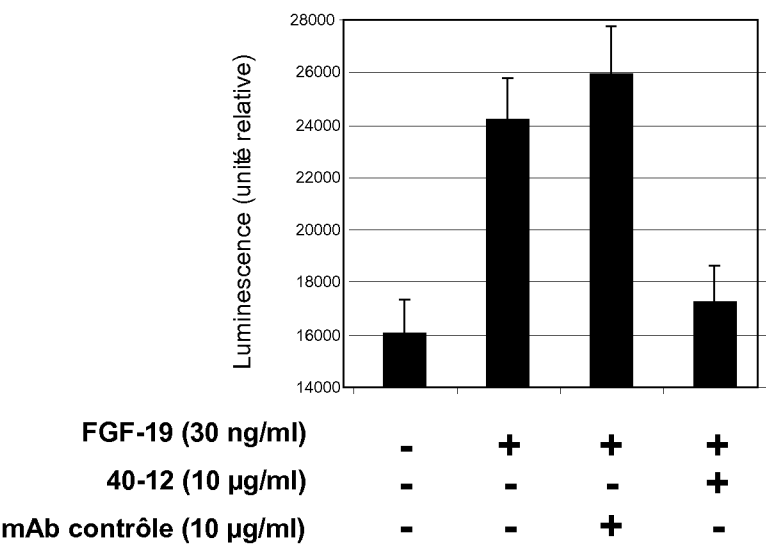


Figure 10B

16/22

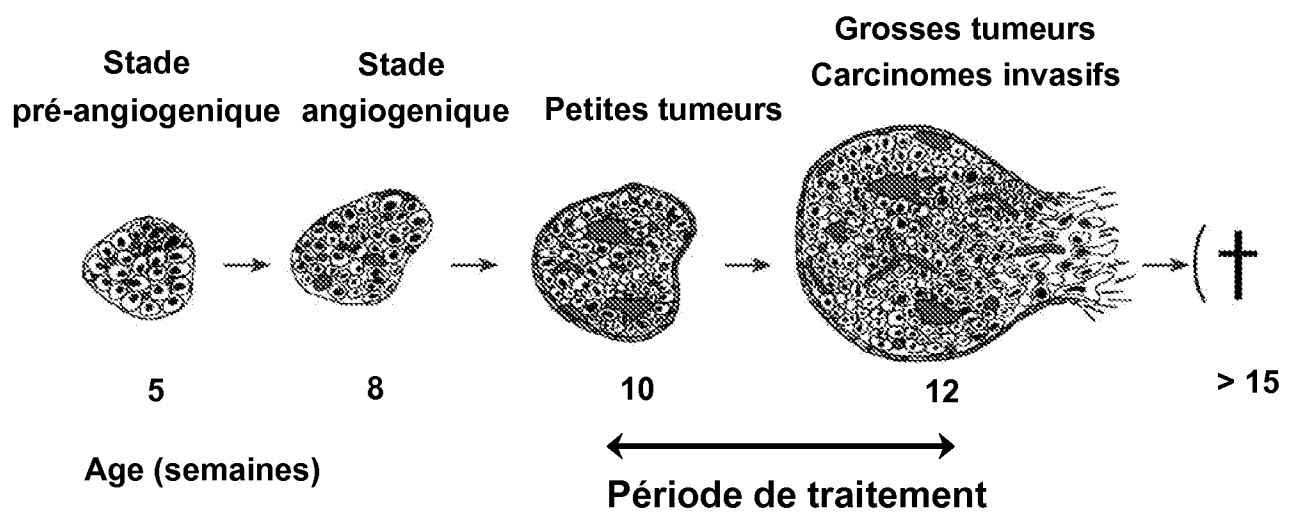


Figure 11 A

17/22

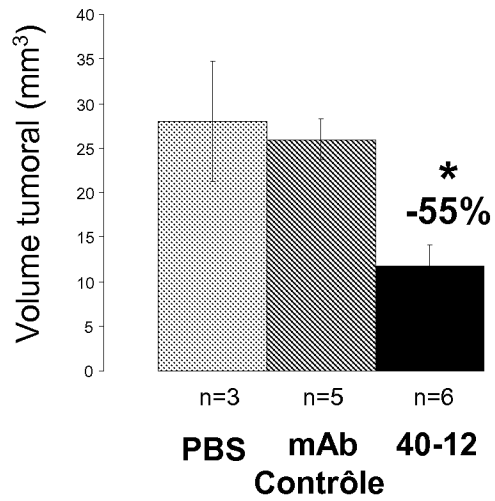


Figure 11B

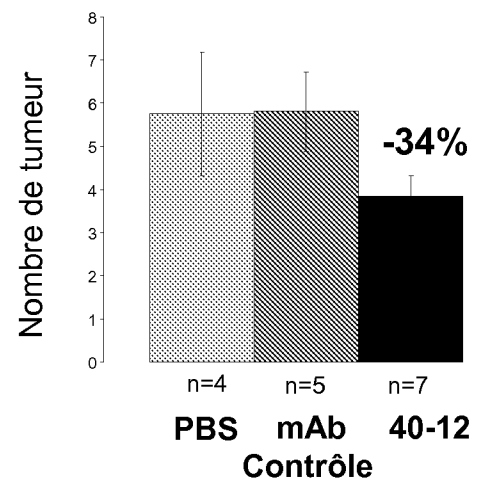


Figure 11C

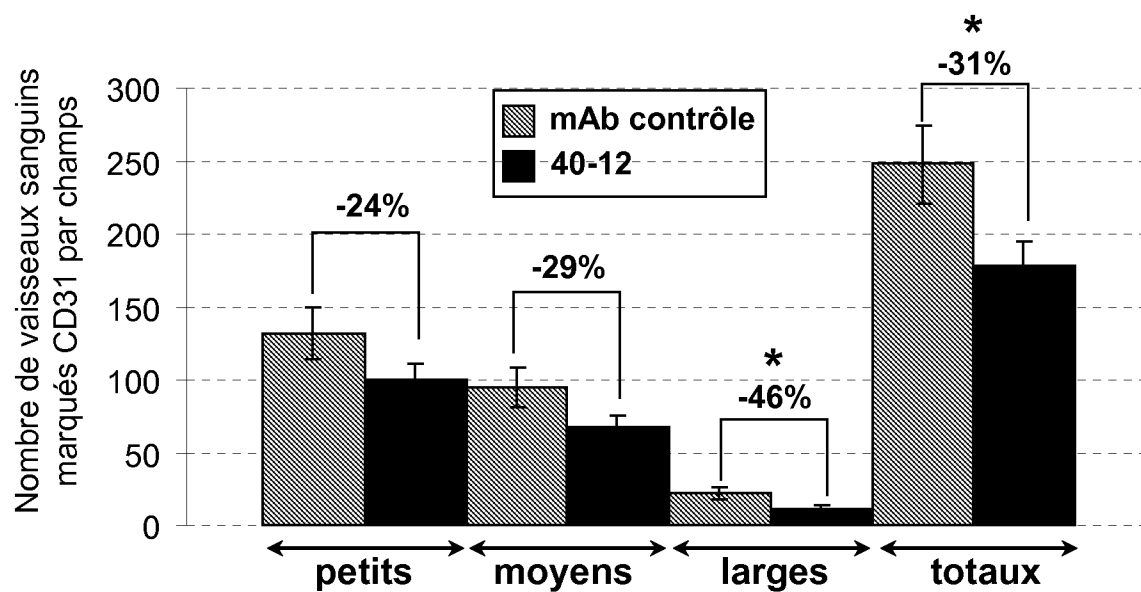


Figure 11D

18/22

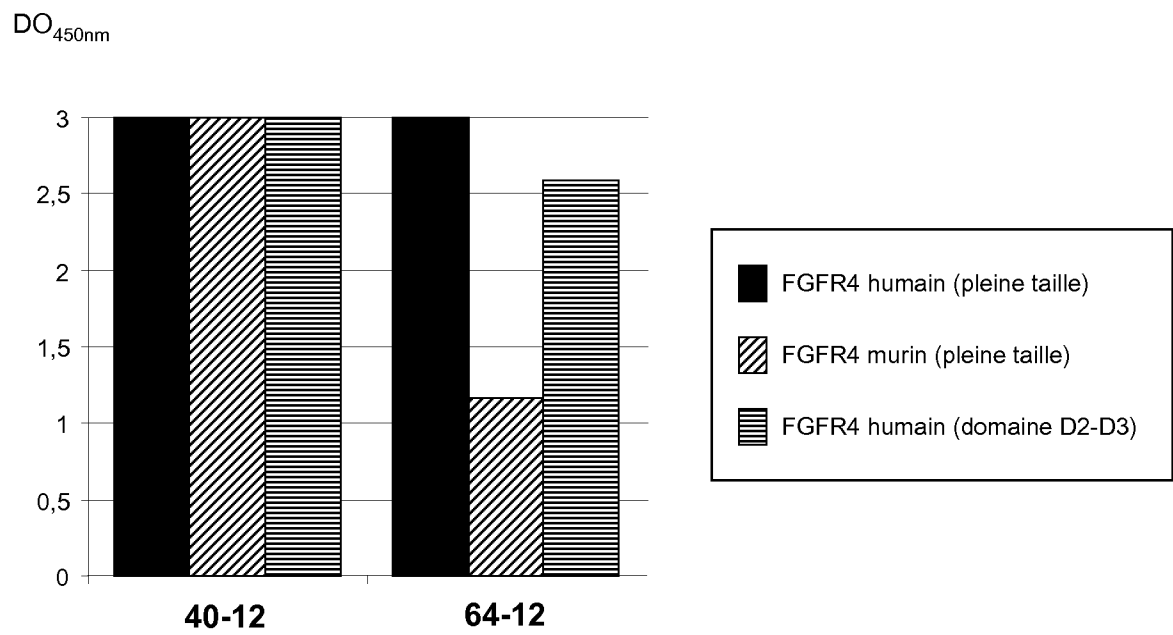


Figure 12

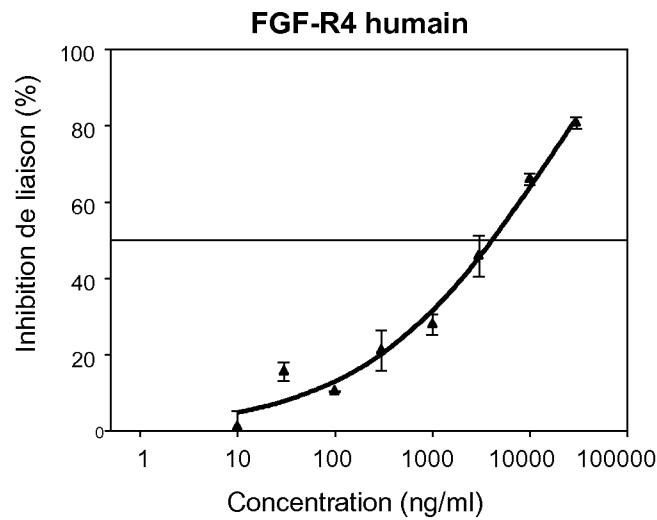


Figure 13A

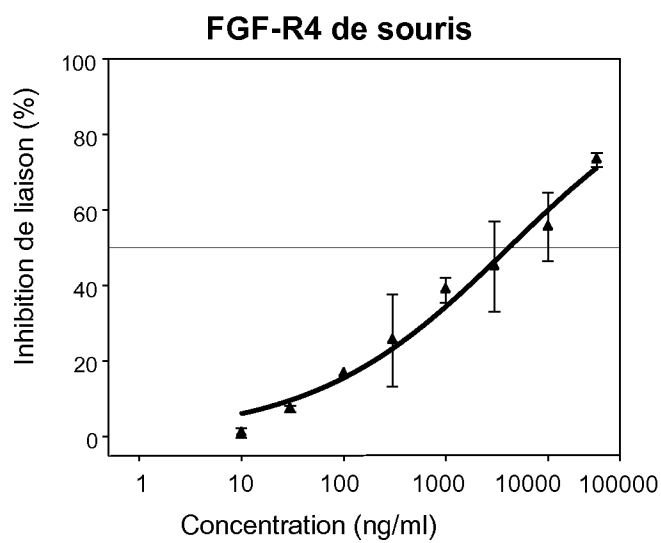


Figure 13B

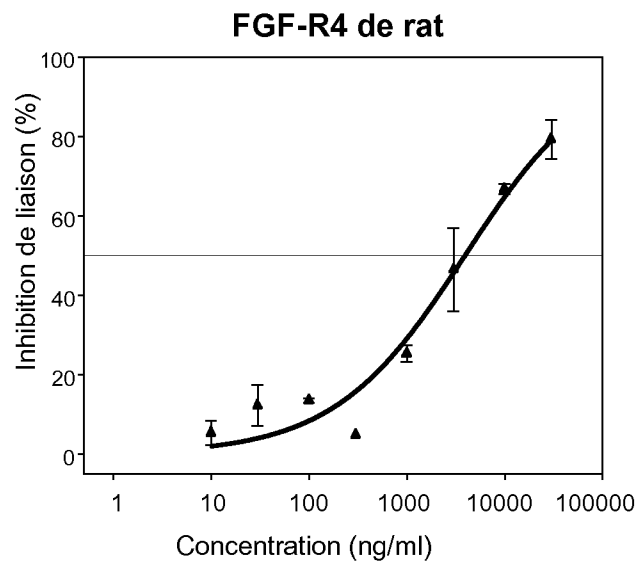


Figure 13C

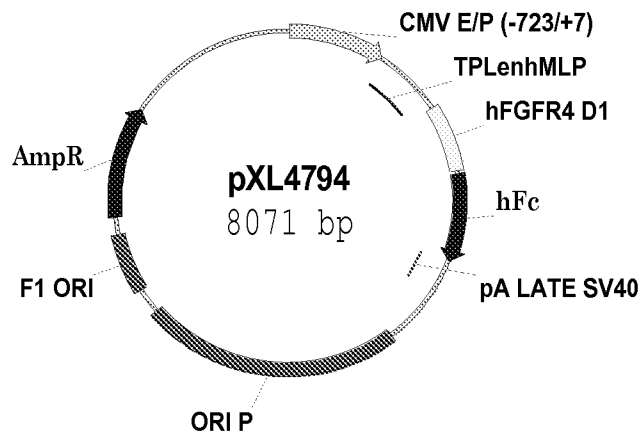


Figure 14A

1	LEASEEVELE	PCLAPSLEQQ	EQELTVALGQ	PVRLCCGRAE	RGGHWYKEGS
51	RLAPAGRVRG	WRGRLEIASF	LPEDAGRYLC	LARGSMIVLQ	NLTLITGDSL
101	TSSNDDDEPK	SHRDLSNRHS	YPQQAPYWTH	PQRMEKKLHA	VPAGNTVKFR
151	CPAAGNPTKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
201	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
251	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
301	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD
351	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPG	

Figure 14B

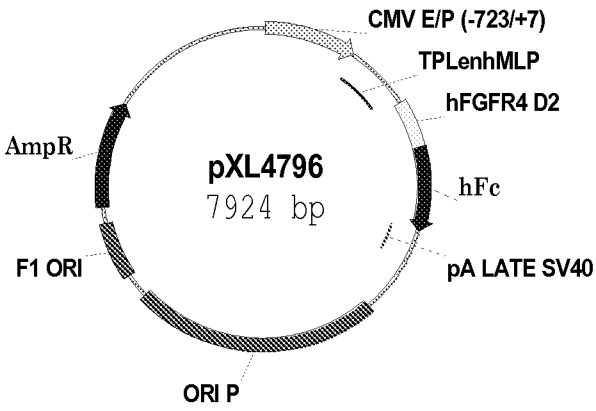


Figure 15A

1	LEASEEVELE	PQAPYWTHPQ	RMEKKLHAVP	AGNTVKFRCP	AAGNPTPTIR
51	WLKDGQAFHG	ENRIGGIRLR	HQHWSLVMES	VVPSDRGTYT	CLVENAVGSI
101	RYNYLLDVLK	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV
151	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD
201	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLP	PSRDELTKNQ
251	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG	SFFLYSKLTV
301	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPG	

Figure 15B

22/22

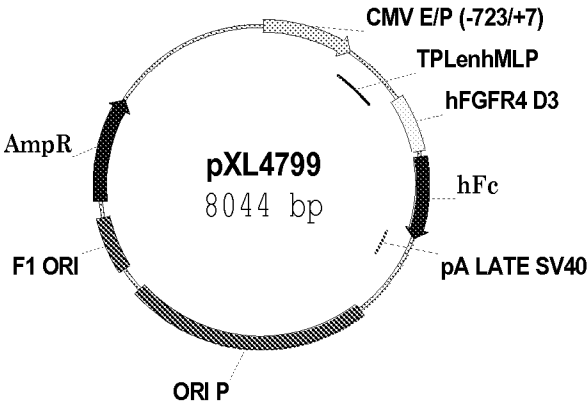


Figure 16A

1	LEASEEVELE	PNAVGSIRYN	YLLDVLERSP	HRPILQAGLP	ANTTAVVGSD
51	VELLCKVYSD	AQPHIQWLKH	IVINGSSFGE	DGFPYVQVLK	TADINSSEVE
101	VLYLRNVSAE	DAGEYTCLAG	NSIGLSYQSA	WLTVLPEEDP	TWTAAAPEAK
151	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE
201	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK
251	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTL	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF
301	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV
351	FSCSVMEAL	HNHYTQKSLS	LSPG		

Figure 16B