

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7692419号
(P7692419)

(45)発行日 令和7年6月13日(2025.6.13)

(24)登録日 令和7年6月5日(2025.6.5)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	

請求項の数 39 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-539176(P2022-539176)

(86)(22)出願日 令和2年12月23日(2020.12.23)

(65)公表番号 特表2023-508174(P2023-508174
A)

(43)公表日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(86)国際出願番号 PCT/CN2020/138659

(87)国際公開番号 WO2021/129672

(87)国際公開日 令和3年7月1日(2021.7.1)

審査請求日 令和5年12月22日(2023.12.22)

(31)優先権主張番号 PCT/CN2019/127904

(32)優先日 令和1年12月24日(2019.12.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 518099859

ディザル(ジアンズー)ファーマシュー
ティカル・カンパニー・リミテッド
中華人民共和国江蘇省, ウーシー, シン
ウー・ディストリクト, イースト・ジン
フイ・ロード, スウィート 4 1 0 5,
ビルディング・イー(ビルディング・ナ
ンパー5)オブ・フィロン・プラザ

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(72)発明者 ワン, メイ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規抗 F G F R 2 b 抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それぞれ配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 に示されるアミノ酸配列である、重鎖相補性決定領域(CDR) 1、2、および 3、並びに、
それぞれ配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列である、軽鎖相補性決定領域(CDR) 1、2、および 3、
を含む単離された抗体であって、F G F R 2 b に特異的に結合することが可能である、抗体。

【請求項 2】

F G F R 2 c に対して検出可能な結合親和性を有さない、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 3】

配列番号 7、もしくは配列番号 1 1 に示される配列を含む重鎖可変領域、または配列番号 7、もしくは配列番号 1 1 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同配列を含み前記相同配列が C D R の外側の領域において置換、挿入または欠失を有する、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号 9 もしくは配列番号 1 3 に示される配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 9 もしくは配列番号 1 3 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同配列を含み前記相同配列が C D R の外側の領域において置換、挿入または欠失を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体。

20

【請求項 5】

a) 配列番号 7 に示される配列を含むか、または配列番号 7 に示される配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 9 に示される配列を含むか、または配列番号 9 に示される配列からなる軽鎖可変領域、または、

b) 配列番号 1 1 に示される配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 に示される配列を含む軽鎖可変領域
を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 6】

FGFR2b に対して特異的な結合親和性を依然として保持する 1 つまたは複数のアミノ酸残基置換または修飾をさらに含み、置換または修飾が、V_HもしくはV_L配列の 1 つもしくは複数に存在するが、CDR配列のいずれかの外側に存在する、請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の抗体。

10

【請求項 7】

免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒト免疫グロブリンの定常領域、または任意選択でヒト IgG の定常領域をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

定常領域が、

- a) グリコシル化部位を導入もしくは除去する、
 - b) 遊離システイン残基を導入する、
 - c) 活性化Fc受容体への結合を増強する、および/または
 - d) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増強する
- 1 つまたは複数の修飾を含む、請求項 7 に記載の抗体。

20

【請求項 9】

キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 10】

ダイアボディ、scFv、scFv二量体、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、Fv断片、Fab、Fab'、F(ab)₂、dsダイアボディである、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 11】

ヒトFGFR2bに、Biacoreによって測定される場合に 1×10^{-9} M以下のK_D値で特異的に結合することが可能である、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の抗体。

30

【請求項 12】

細胞表面上に発現されたヒトFGFR2bに、フローサイトメトリーによって測定される場合に 10 nM以下のEC₅₀で特異的に結合することが可能である、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 13】

ヒトFGFR2b、カニクイザルFGFR2b、ラットFGFR2b、およびマウスFGFR2bに特異的に結合することが可能である、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 14】

細胞表面上に発現されたヒトFGFR2bに特異的に結合し、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム比色アッセイによって測定される場合に 10 nM以下の50%成長阻害濃度(GI₅₀)で前記細胞の増殖を阻害することが可能である、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の抗体。

40

【請求項 15】

1 つまたは複数のコンジュゲート部分に連結されている、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 16】

コンジュゲート部分が、治療剤、放射性同位体、検出可能な標識、薬物動態修飾部分、

50

または精製部分を含む、請求項 1 5 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

コンジュゲート部分が、直接的に、またはリンカーを介して共有結合されている、請求項 1 6 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

リンカーが、ヒドラジンリンカー、ジスルフィドリンカー、二官能性リンカー、ジペプチドリンカー、グルクロニドリンカー、チオエーテルリンカーであり、任意選択で、リンカーが、リソソームで切断可能なジペプチド、例えば、バリン - シトルリン (v c) である、請求項 1 7 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

コンジュゲート部分が、表面に露出されたアミノ酸残基の特定のタイプにランダムに結合され、任意選択で、特定の残基が、システイン残基、またはリジン残基である、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 0】

コンジュゲート部分が、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、短鎖ペプチドタグ、または A s n 2 9 7 グリカンを通じて、抗体分子における明確に規定された部位に結合される、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 1】

治療剤が、細胞傷害剤を含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4 に示される塩基配列、および配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、または配列番号 1 4 に示される塩基配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、相同配列が、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、または配列番号 1 4 によってコードされるのと同じタンパク質をコードする、請求項 2 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 または 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体を産生する方法であって、請求項 2 5 に記載の宿主細胞を、請求項 2 4 に記載の発現ベクターが発現される条件下で培養する工程を含む、方法。

【請求項 2 7】

宿主細胞によって産生された抗体を精製する工程をさらに含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体、および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 2 9】

対象において F G F R 2 b 関連疾患または状態を処置するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 3 0】

疾患または状態が癌であり、任意選択で、癌が、F G F R 2 b を発現または過剰発現することを特徴とする、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

癌が、卵巣癌、子宮内膜癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸

10

20

30

40

50

直腸癌、膀胱癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌、腎細胞癌、頭頸部癌、中皮腫、黒色腫、肉腫、および脳腫瘍である、請求項 3 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

経口、経鼻、静脈内、皮下、舌下、または筋内投与用である、請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

対象がヒトである、請求項 2 9 ~ 3 2 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

試料中の F G F R 2 b の存在または量を検出する方法であって、試料を請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体と接触させる工程と、試料中の F G F R 2 b の存在または量を決定する工程とを含む、方法。

10

【請求項 3 5】

対象において F G F R 2 b 関連疾患または状態を診断するための指標を提供する方法であって、

a) 対象から得られる試料を、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体と接触させる工程と、

b) 試料中の F G F R 2 b の存在または量を決定する工程と、

c) F G F R 2 b の存在または量を、対象における F G F R 2 b 関連疾患または状態の实在または状況と関連させる工程と

を含む、方法。

20

【請求項 3 6】

対象において F G F R 2 b 関連疾患または状態を予後判定するための指標を提供する方法であって、

a) 対象から得られる試料を、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体と接触させる工程と、

b) 試料中の F G F R 2 b の存在または量を決定する工程と、

c) F G F R 2 b の存在または量を、対象の、F G F R 2 b アンタゴニストに対する潜在的応答性と関連させる工程と

を含む、方法。

【請求項 3 7】

処置を必要とする対象において F G F R 2 b 関連疾患または状態を処置するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体の使用。

30

【請求項 3 8】

F G F R 2 b 関連疾患または状態を検出するための診断試薬の製造における、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体の使用。

【請求項 3 9】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体を含む、F G F R 2 b を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[0001]本開示は一般に、新規抗ヒト F G F R 2 b 抗体に関する。

40

【背景技術】

【0002】

[0002]線維芽細胞増殖因子受容体 (F G F R) は、4 つの構造的に関連した遺伝子 (F G F R 1 ~ F G F R 4) によってコードされる膜貫通チロシンキナーゼである。F G F R は、それらの mRNA の多重選択的スプライシングを特徴とし、様々なアイソフォームをもたらす (Or n i t z ら、J . B i o l . C h e m . 2 7 1 : 1 5 2 9 2 頁、1 9 9 6 年 ; またヒト F G F R 2 およびそのアイソフォームの配列に関する U n i P r o t K B P 2 1 8 0 2 およびアイソフォーム P 2 1 8 0 2 - 1 ~ P 2 1 8 0 2 - 2 3 ; ヒト F G F R 1 およびそのアイソフォームの配列に関する U n i P r o t K B P 1 1 3 6 2 および

50

アイソフォーム P 1 1 3 6 2 - 1 ~ P 1 1 3 6 2 - 2 1 も参照)。F G F R は、種々の I g 様ドメイン (アイソフォームは、3 つ全ての I g 様ドメイン D 1、D 2、および D 3 を含有し、 アイソフォームは、2 つの I g 様ドメイン D 2 および D 3 ドメインのみを含有するが、D 1 を有さない)、膜貫通ドメイン、および細胞内チロシンキナーゼ触媒ドメインで構成される細胞外リガンド結合セクションからなる共通の構造的特徴を有する。F G F は、主に受容体の D 2 および D 3 における領域を通じて受容体に結合する。F G F R 1 ~ F G F R 3 において、全ての形態が、D 3 の最初の半分を含有し、D 3 の最初の半分のみを含有するアイソフォームは、I I I a 形態と表示される一方で、2 つの選択的エクソンは、D 3 の第 2 の半分を利用することができ、I I I b 形態および I I I c 形態を生じる。例えば、F G F R - 1 では、第 3 の I g 様ドメインをコードするエクソンの選択的

10

【0003】

[0003] F G F R への結合時の F G F は、特に胚発生中に、増殖、遊走および分化を含む各種細胞型において様々な応答を媒介し (O r n i t z ら、J . B i o l . C h e m . 2 7 1 : 1 5 2 9 2 頁、1 9 9 6 年)、成体では、組織恒常性および修復に参与している。K G F (F G F 7) および K G F R (F G F R 2 I I I b) は、膵癌、胃癌、卵巣癌および乳癌等の様々なタイプの癌に参与すると見出されている。F G F 7 および F G F R 2 b は、膵癌において過剰発現され (I s h i w a t a ら、A m . J . P a t h o l . 1 5 3 : 2 1 3 頁、1 9 9 8 年)、それらの同時発現は、乏しい予後と相関する (C h o ら、A m . J . P a t h o l . 1 7 0 : 1 9 6 4 頁、2 0 0 7 年)。F G F R 2 の増幅および過剰発現は、特に乏しい予後を有する未分化のびまん型の胃癌と強力に関連付けられ、小分子化合物による F G F R 2 活性の阻害は、かかる癌細胞の増殖を強力に阻害した (K u n i i ら、C a n c e r R e s . 6 8 : 2 3 4 0 頁、2 0 0 8 年; N a k a m u r a ら、G a s t r o e n t e r o l . 1 3 1 : 1 5 3 0 頁、2 0 0 6 年)。F G F R 2 b リガンド F G F 1、F G F 7 および F G F 1 0 は、E O C 細胞系において、増殖、運動性および細胞死からの防御を誘導し (S t e e l e ら、G r o w t h F a c t o r s 2 4 : 4 5 頁、2 0 0 6 年)、F G F R 2 b が、卵巣癌において悪性表現型に寄与し得ることを示唆した。F G F R 2 b は、乳癌の約 5 % で高度に発現され (F i n c h および R u b i n 2 0 0 6 年)、M A P K および P I 3 K を介してシグナル伝達カスケードを媒介する (M o f f a、T a n n h e i m e r ら 2 0 0 4 年)。頻発する活性化 F G F R 2 突然変異 (例えば、S 2 5 2 W) はまた、各種癌と関連付けられることが発見されている。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

[0004] 新規抗 F G F R 2 b 抗体が非常に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

[0004] 本開示全体にわたって、冠詞「a」、「an」および「the」は、冠詞の文法的対象の 1 つまたは 1 つよりも多い対象 (即ち、少なくとも 1 つ) を指すのに本明細書で使用される。例として、「抗体」は、1 つの抗体または 1 つよりも多い抗体を意味する。

【0006】

50

[0005]本開示は、新規モノクローナル抗 F G F R 2 b 抗体、それらのアミノ酸およびヌクレオチド配列、ならびにそれらの使用を提供する。

[0006]1つの態様では、本開示は、配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 5 からなる群から選択される 1 個、2 個もしくは 3 個の重鎖相補性決定領域 (C D R) 配列、ならびに / または配列番号 2、配列番号 4 および配列番号 6 からなる群から選択される 1 個、2 個もしくは 3 個の軽鎖 C D R 配列を含む単離された抗 F G F R 2 b 抗体であって、F G F R 2 b に特異的に結合することが可能である、抗体を提供する。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、F G F R 2 c に対して検出可能な結合親和性を有さない。

【 0 0 0 7 】

[0007]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 5 の重鎖 C D R 3、および / または配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 を含む。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 5 からなる群から選択される 1 個、2 個もしくは 3 個の重鎖 C D R 配列を有する重鎖可変領域 (V_H)、ならびに / または配列番号 2、配列番号 4 および配列番号 6 からなる群から選択される 1 個、2 個もしくは 3 個の軽鎖 C D R 配列を有する軽鎖可変領域 (V_L) を含む。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 を含む重鎖可変領域 (V_H)、ならびに / または配列番号 2、配列番号 4 および配列番号 6 を含む軽鎖可変領域 (V_L) を含む。

【 0 0 0 8 】

[0008]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 7 もしくは配列番号 11 を含む重鎖可変領域または配列番号 7 もしくは配列番号 11 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 9 もしくは配列番号 13 を含む軽鎖可変領域または配列番号 9 もしくは配列番号 13 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 7 を含む重鎖可変領域および配列番号 9 を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、配列番号 11 を含む重鎖可変領域および配列番号 13 を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 0 9 】

[0009]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、F G F R 2 b に対して特異的な結合親和性を依然として保持する 1 つまたは複数のアミノ酸残基置換または修飾をさらに含む。一部の実施形態において、置換または修飾の少なくとも 1 つが、C D R 配列の 1 つもしくは複数に、および / または V_H もしくは V_L 配列の 1 つもしくは複数に存在するか、または V_H もしくは V_L 配列の 1 つもしくは複数に存在するが、C D R 配列のいずれかの外側に存在する。

【 0 0 1 0 】

[00010]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒト免疫グロブリンの定常領域、好ましくはヒト I g G の定常領域、より好ましくはヒト I g G 1 の定常領域をさらに含む。

【 0 0 1 1 】

[00011]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、その定常領域内に、a) グリコシル化部位を導入もしくは除去する、b) 遊離システイン残基を導入する、c) 活性化 F c 受容体への結合を増強する、および / または d) 抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を増強する 1 つまたは複数の修飾をさらに含む。

【 0 0 1 2 】

[00012]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、糖鎖操作されている (g l y c o - e n g i n e e r e d)。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、脱フコシル化されている (a f u c o s y l a t e d)。一部の実施形態において、本明細書に提供される脱フコシル化された抗体は、A s n 2 9 7 にてフコースを欠如している。一部の実施形態において、糖鎖操作された抗体は、その操作されていない対

10

20

30

40

50

応物よりも増強されたADCC活性を示す。一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。一部の他の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト化抗体である。

【0013】

[00013]一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1つまたは複数のコンジュゲート部分に連結されている。ある特定の実施形態において、コンジュゲート部分は、治療剤、放射性同位体、検出可能な標識、薬物動態修飾部分、または精製部分を含む。一部の実施形態において、コンジュゲート部分は、直接的に、またはリンカーを介して共有結合されている。

【0014】

[00014]別の態様において、本開示は、FGFR2bに対する結合に関して、上述の抗体と競合する単離された抗体またはそれらの抗原結合断片をさらに提供する。

[00015]一態様において、本開示は、本明細書で提供される抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、および配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14に対して少なくとも80%の配列同一性を有するその相同配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、相同配列は、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14によってコードされるのと同じタンパク質をコードする。

【0015】

[00016]別の態様において、本開示は、本明細書で提供される単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

[00017]さらに別の態様において、本開示は、本開示の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0016】

[00018]さらに別の態様において、本開示は、本明細書で提供される抗体を産生する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、本開示の宿主細胞を、本開示の発現ベクターが発現される条件下で培養する工程を含む。一部の実施形態において、本方法は、宿主細胞によって産生された抗体を精製する工程をさらに含む。

【0017】

[00019]さらに別の態様において、本開示は、本明細書で提供される抗体、および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

[00020]別の態様において、本開示は、対象においてFGFR2b関連疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の本開示の抗体または医薬組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

【0018】

[00021]一部の実施形態において、疾患または状態は癌であり、任意選択で、癌は、FGFR2bを発現または過剰発現することを特徴とする。

[00022]一部の実施形態において、投与は、経口、経鼻、静脈内、皮下、舌下、または筋内投与を介する。一部の実施形態において、対象はヒトである。

【0019】

[00023]別の態様において、本開示は、試料中のFGFR2bの存在または量を検出する方法であって、試料を本開示の抗体と接触させる工程と、試料中のFGFR2bの存在または量を決定する工程とを含む、方法を提供する。

【0020】

[00024]別の態様において、本開示は、対象においてFGFR2b関連疾患または状態を診断する方法であって、a)対象から得られる試料を、本開示の抗体と接触させる工程と、b)試料中のFGFR2bの存在または量を決定する工程と、c)FGFR2bの存在または量を、対象におけるFGFR2b関連疾患または状態の实在または状況と関連させる工程とを含む、方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

[00025]別の態様において、本開示は、対象においてF G F R 2 b関連疾患または状態を予後判定する(p r o g n o s i n g)方法であって、

a) 対象から得られる試料を、本開示の抗体と接触させる工程と、 b) 試料中のF G F R 2 bの存在または量を決定する工程と、 c) F G F R 2 bの存在または量を、対象の、F G F R 2 bアンタゴニストに対する潜在的応答性と関連させる工程を含む、方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

[00026]別の態様において、本開示は、対象においてF G F R 2 b発現の調節から利益を受ける疾患または状態を処置するための薬剤の製造における、本開示の抗体の使用を提供する。

10

【 0 0 2 3 】

[00027]別の態様において、本開示は、F G F R 2 b関連疾患または状態を検出するための診断試薬の製造における、本開示の抗体の使用を提供する。

[00028]さらに別の態様において、本開示は、本開示の抗体を含む、F G F R 2 bを検出するためのキットを提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 4 】

【 図 1 】 [00029] C D R に下線を付した、全 A b h u 3 6 - 2 (図中では「 h u 3 6 - 2 」と表示される) の軽鎖 (A) および重鎖 (B) のアミノ酸配列。

20

【 図 2 】 [00030] 参照比較用の対照抗体として F P A 1 4 4 を用いた、ヒト F G F R 2 b に対する A b 3 6 c、および h u 3 6 - 2 (それぞれ、図中では「 3 6 c 」および「 h u 3 6 - 2 」と表示される) の B i a c o r e 結合 K_a 、 K_{off} 、および親和性 K_D 。

【 図 3 】 [00031] K A T O I I I 細胞でのキメラ A b 3 6 の、F G F R 2 b への用量依存的結合のフローサイトメトリー。

【 図 4 】 [00032] A b 3 6 c の、ヒト、カニクイザル、およびラット / マウス F G F R 2 b への種間結合。

【 図 5 】 [00033] ヒト F G F R の各種ファミリーメンバーに対するマウス A b 3 6 (図中では「 3 6 」と表示される) の結合選択性。

【 図 6 】 [00034] 陰性対照としてアイソタイプヒト I g G 1 を用いた、A b 3 6 c によるヒト F G F R 2 b で安定にトランスフェクトした B a / F 3 細胞の F G F 7 誘導性細胞増殖の阻害。

30

【 図 7 】 [00035] A b 3 6 c による F G F R 2 b リン酸化およびその下流の標的 E R K リン酸化の用量依存的ダウンレギュレーション。

【 図 8 】 [00036] 抗体 3 6 c および h u 3 6 - 2 の、K A T O I I I に対する A D C C 活性。

【 図 9 A 】 [00037] S N U 1 6 胃癌異種移植片モデルにおける週に 2 度 1 0 m g / k g で腹腔内投与した A b 3 6 c の i n v i v o 抗腫瘍有効性。F P A 1 4 4 を比較として使用した。

【 図 9 B 】 L C 0 3 8 患者由来異種移植片肺癌モデルにおける週に 2 度 1 0 m g / k g で腹腔内投与した A b 3 6 c の i n v i v o 抗腫瘍有効性。F P A 1 4 4 を比較として使用した。

40

【 図 9 C 】 K Y S E 1 8 0 モデルにおける週に 2 度 1 0 m g / k g で腹腔内投与した A b 3 6 c の i n v i v o 抗腫瘍有効性。F P A 1 4 4 を比較として使用した。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 5 】

[00038]本開示の下記の説明は、単に本開示の各種実施形態を説明することを意図されるに過ぎない。したがって、論述される特定の修飾は、本開示の範囲に対する限定と解釈されるべきではない。本開示の範囲を逸脱することなく、様々な等価体、変更、および修正がなされ得ることは当業者に明らかであり、かかる等価な実施形態は本明細書に包含さ

50

れるべきであることが理解されよう。刊行物、特許および特許出願を含む本明細書で引用される参考文献は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0026】

[00039]定義

[00040]「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、任意の免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多価抗体、二価抗体、一価抗体、多特異性抗体、二特異性抗体ならびに特異的な抗原に結合するそれらの抗原結合断片を包含する。天然のインタクトな抗体は、2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む。哺乳動物重鎖は、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューとして分類され、重鎖はそれぞれ、可変領域(V_H)ならびに第1、第2、および第3の定常領域(それぞれ C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})からなり、哺乳動物軽鎖は、またはとして分類される一方で、軽鎖はそれぞれ、可変領域(V_L)および定常領域からなる。抗体は、「Y」形状を有し、Yの基部は、ジスルフィド結合を介して一緒に結合された2つの重鎖の第2および第3の定常領域からなる。Yの各アームは、単一軽鎖の可変領域および定常領域に結合された単一重鎖の可変領域および第1の定常領域を包含する。軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原結合に参与している。両鎖における可変領域は概して、相補性決定領域(CDR)(LC_{DR1} 、 LC_{DR2} 、および LC_{DR3} を含む軽鎖CDR、 HC_{DR1} 、 HC_{DR2} 、 HC_{DR3} を含む重鎖CDR)と呼ばれる3つの高度可変ループを含有する。本明細書に開示される抗体に関するCDR境界は、Kabata、IMGT、Chothia、またはAl-Lazikaniの慣例によって規定または同定され得る(Al-Lazikani、B.、Chothia、C.、Lesk, A.M.、J. Mol. Biol.、273(4)、927頁(1997年); Chothia、C.ら、J. Mol. Biol. 12月5日; 186(3): 651~63頁(1985年); Chothia、C.およびLesk, A.M.、J. Mol. Biol.、196、901頁(1987年); Chothia、C.ら、Nature. 12月21日~28日; 342(6252): 877~83頁(1989年); Kabata E.A.ら、National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991年); Marie-Paule Lefrancら、Developmental and Comparative Immunology、27: 55~77頁(2003年); Marie-Paule Lefrancら、Immunome Research、1(3)、(2005年); Marie-Paule Lefranc、Molecular Biology of B cells (第2版); chapter 26、481~514頁(2015年))。3つのCDRは、フレームワーク領域(FR)として既知のランキングストレッチ間に挿入されており、フレームワーク領域(FR)は、CDRよりも高度に保存されており、高頻度可変ループを支持するようにスキヤフォールドを形成する。重鎖および軽鎖の定常領域は、抗原結合に参与されないが、各種エフェクター機能を示す。抗体は、それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づいて、クラスに割り当てられる。抗体の5つの主要なクラスまたはアイソタイプは、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMであり、それらは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミュー重鎖の存在を特徴とする。主要抗体クラスの幾つかは、IgG1(ガンマ1重鎖)、IgG2(ガンマ2重鎖)、IgG3(ガンマ3重鎖)、IgG4(ガンマ4重鎖)、IgA1(アルファ1重鎖)、またはIgA2(アルファ2重鎖)等のサブクラスに分類される。

【0027】

[00041]「抗原結合断片」という用語は、本明細書で使用する場合、1つまたは複数のCDRを含むインタクトな抗体の一部から形成される抗体断片、または抗原に結合し得るが、インタクトな天然の抗体構造を含まない任意の他の抗体断片を指す。抗原結合断片の例として、ダイアボディ、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、Fv断片、ジスルフィドで安定化されたFv断片($dsFv$)、 $(dsFv)_2$ 、二特異性 $dsFv$ ($dsFv-dsFv'$)、ジスルフィドで安定化されたダイアボディ(ds ダイアボディ)、単鎖抗体分子($scFv$)、単鎖Fv-Fc抗体($scFv-Fc$)、 $scFv$ 二量体(二価ダイアボ

10

20

30

40

50

ディ)、二特異性抗体、多特異性抗体、ラクダ化 (camelized) 単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、および二価ドメイン抗体が挙げられるが、限定されない。抗原結合断片は、親抗体が結合する同じ抗原に結合することが可能である。

【0028】

[00042]抗体に関する「Fab」は、ジスルフィド結合によって単一重鎖の可変領域および第1の定常領域に結合された単一軽鎖 (可変領域および定常領域の両方) からなる抗体の当該部分を指す。

【0029】

[00043]「Fab'」は、ヒンジ領域の一部を含む Fab 断片を指す。

[00044]「F(ab')₂」は、Fab' の二量体を指す。抗体に関する「Fv」は、完全抗原結合部位を保有する抗体の最小断片を指す。Fv断片は、単一重鎖の可変領域に結合された単一軽鎖の可変領域からなる。

10

【0030】

[00045]「dsFv」は、単一軽鎖の可変領域と、単一重鎖の可変領域との間の結合がジスルフィド結合であるジスルフィドで安定化された Fv断片を指す。一部の実施形態において、「(dsFv)₂」または「(dsFv-dsFv')」は、3つのペプチド鎖: ジスルフィド結合を介して、それぞれ、ペプチドリンカー (例えば、長い可撓性リンカー) によって連結され、また2つのV_L部分に結合された2つのV_H部分を含む。一部の実施形態において、dsFv-dsFv' は二特異性であり、そこでは、各ジスルフィド対形成重鎖および軽鎖は、異なる抗原特異性を有する。

20

【0031】

[00046]「単鎖Fv抗体」または「scFv」は、直接的に、またはペプチドリンカー配列を介して互いに結合された軽鎖可変領域および重鎖可変領域からなる操作された抗体を指す (Houston JSら Proc Natl Acad Sci USA、85: 879頁 (1988年))。

【0032】

[00047]抗体に関する「Fc」は、ジスルフィド結合を介して、第2の重鎖の第2および第3の定常領域に結合された第1の重鎖の第2および第3の定常領域からなる抗体の当該部分を指す。抗体のFc部分は、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、および補体依存性細胞傷害 (CDC) 等の各種エフェクター機能に関与するが、抗原結合において機能しない。

30

【0033】

[00048]「単鎖Fv-Fc抗体」または「scFv-Fc」は、抗体のFc領域に結合されたscFvからなる操作された抗体を指す。

[00049]「ラクダ化単ドメイン抗体」、「重鎖抗体」、または「HCAb」は、2つのV_Hドメインを含有し、軽鎖を含有しない抗体を指す (Riechmann L. および Muyldermans S., J Immunol Methods. 12月10日; 231(1-2): 25~38頁 (1999年); Muyldermans S., J Biotechnol. 6月; 74(4): 277~302頁 (2001年); 国際公開第94/04678号; 国際公開第94/25591号; 米国特許第6,005,079号)。重鎖抗体は、本来ラクダ科 (Camelidae) (ラクダ、ヒトコブラクダ、およびラマ) に由来する。ラクダ化抗体は、軽鎖を欠如するが、真正抗原結合レパトアを有する (Hamers-Casterman C.ら、Nature. 6月3日; 363(6428): 446~8頁 (1993年); Nguyen VK.ら「Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation」、Immunogenetics. 4月; 54(1): 39~47頁 (2002年); Nguyen VK.ら Immunology. 5月; 109(1): 93~101頁 (2003年))。重鎖抗体の可変ドメイン (「V_HHドメイン」) は、適応免疫応答によって生成される最小の既知抗原結合単位を表す (Koch-Nolte F.ら、FASEB J. 11月; 21(13): 3490~8頁

40

50

. Epub 2007年6月15日(2007年)。

【0034】

[00050]「ナノボディ」は、従来のIgGの重鎖抗体由来の1つのV_Hドメイン、および2つの重鎖定常ドメイン、例えばCH₂およびCH₃からなる抗体断片を指す。

[00051]「ダイアボディ」または「dAb」は、2つの抗原結合部位を有する小抗体断片を含み、ここで、断片は、同じポリペプチド鎖中でV_Lドメインに結合されたV_Hドメイン(V_H-V_LまたはV_L-V_H)を含む(例えば、Holliger P.ら、Proc Natl Acad Sci U S A, 7月15日; 90(14): 6444~8頁(1993年); 欧州特許第404097号; 国際公開第93/11161号を参照)。短すぎて同じ鎖上の2つのドメイン間で対形成を不可能にさせるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補ドメインと対形成せざるを得ず、それにより、2つの抗原結合部位を創出する。抗原結合部位は、同じ抗原または異なる抗原(またはエピトープ)を標的とし得る。ある特定の実施形態において、「二特異性dsダイアボディ」は、2つの異なる抗原(またはエピトープ)を標的とするダイアボディである。

【0035】

[00052]ある特定の実施形態において、「scFv二量体」は、一方の部分のV_Hが他方の部分のV_Lと調和して、同じ抗原(またはエピトープ)または異なる抗原(またはエピトープ)を標的とし得る2つの結合部位を形成するように別のV_H-V_L部分と二量体化されたV_H-V_L(ペプチドリンカーによって連結された)を含む二価ダイアボディまたは二価ScFv(BsFv)である。他の実施形態において、「scFv二量体」は、V_{H1}およびV_{L1}が調和して、V_{H2}およびV_{L2}が調和して、調和された対がそれぞれ、異なる抗原特異性を有するようにV_{L1}-V_{H2}(ペプチドリンカーによって連結された)と結合されたV_{H1}-V_{L2}(同様にペプチドリンカーによって連結された)を含む二特異性ダイアボディである。

【0036】

[00053]「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する抗体断片を指す。場合によっては、2つまたはそれよりも多いV_Hドメインがペプチドリンカーと共有結合されて、二価または多価ドメイン抗体を創出する。二価ドメイン抗体の2つのV_Hドメインは、同じ抗原または異なる抗原を標的とし得る。

【0037】

[00054]「キメラ」という用語は、本明細書で使用する場合、1つの種に由来する重および/または軽鎖の一部、および異なる種に由来する重および/または軽鎖の残部を有する抗体または抗原結合断片を意味する。実例では、キメラ抗体は、ヒトに由来される定常領域およびマウス等の非ヒト動物由来の可変領域を含み得る。一部の実施形態において、非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、またはハムスターである。

【0038】

[00055]「ヒト化」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体または抗原結合断片が、非ヒト動物に由来するCDR、ヒトに由来されるFR領域を含み、適用可能である場合、定常領域はヒトに由来されることを意味する。

【0039】

[00056]「二価」という用語は、本明細書で使用する場合、2つの抗原結合部位を有する抗体または抗原結合断片を指し、「一価」という用語は、唯一の抗原結合部位を有する抗体または抗原結合断片を指し、「多価」という用語は、多重抗原結合部位を有する抗体または抗原結合断片を指す。

【0040】

[00057]本明細書で使用する場合、「二特異性」抗体は、2つの異なるモノクローナル抗体に由来する断片を有し、2つの異なるエピトープに結合することが可能な人工抗体または抗原結合断片を指す。2つのエピトープは、同じ抗原上に存在し得るか、または2つのエピトープは、2つの異なる抗原上に存在し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

[00058]別記されない限り、「FGFR」という用語は、本明細書で使用する場合、線維芽細胞増殖因子受容体ファミリーメンバー（FGFR1～FGFR4）のいずれかまたは全てを包含し、FGFRの任意の形態、例えば、1）例えば対立遺伝子変異体を含む、天然の未処理FGFR分子、「完全長」FGFR鎖またはFGFRの天然に存在する変異体、2）細胞における処理に起因するFGFRの任意の形態、例えば、種々のスプライシング形態、例えば、FGFR1b、FGFR1c、FGFR2a、FGFR2b、FGFR2c等、または3）組換え法により生成されたFGFRサブユニットの断片（例えば、切断形態、細胞外/膜貫通ドメイン）または修飾形態（例えば、突然変異形態、グリコシル化/PEG化、His-タグ/免疫蛍光融合形態）を包含すると意図される。「FGFR」は本明細書で使用する場合、霊長類（例えば、ヒト、サル）および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物供給源に由来し得る。

10

【 0 0 4 2 】

[00059]「FGFR2IIIb」および「FGFR2b」という用語は、交換可能に使用され、FGFR2のサブタイプIIIbスプライス形態を指す。FGFR2bの例示的な配列として、ホモサピエンス（*Homo sapiens*）（ヒト）FGFR2bタンパク質（例えば、シグナルペプチドを有する前駆物質配列、Genbankアクセッション番号：NP_075259.4）、ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）（ラット）FGFR2bタンパク質（例えば、完全配列、Genbankアクセッション番号：NP_001103363.1）、ハツカネズミ（*Mus musculus*）（マウス）FGFR2bタンパク質（例えば、完全配列、Genbankアクセッション番号：NP_963895.2）が挙げられる。

20

【 0 0 4 3 】

[00060]「FGFR2IIIc」または「FGFR2c」は、交換可能に使用され、FGFR2のサブタイプIIIcスプライス形態を指す。FGFR2cの例示的な配列として、ヒトFGFR2cタンパク質（例えば、前駆物質配列、Genbankアクセッション番号：NP_000132.3）、ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）（ラット）FGFR2cタンパク質（例えば、完全配列、Genbankアクセッション番号：NP_001103362.1）、ハツカネズミ（*Mus musculus*）（マウス）FGFR2cタンパク質（例えば、完全配列、Genbankアクセッション番号：NP_034337.2）が挙げられる。

30

【 0 0 4 4 】

[00061]「抗FGFR2b抗体」という用語は、FGFR2bに特異的に結合することが可能な抗体を指す。一部の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、FGFR2bの両方に特異的に結合することが可能であるが、FGFR1b、FGFR2cおよびFGFR1cに結合しないか、またはFGFR1b、FGFR2cおよびFGFR1cにあまり結合しない（例えば、FGFR1b、FGFR2cまたはFGFR1cに対する結合親和性は、FGFR2bに対する結合親和性よりも少なくとも10倍低いか、または少なくとも50倍低いか、または少なくとも100倍低いか、または少なくとも200倍低い）。一部の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、FGFR1b、FGFR2cおよびFGFR1cに対して検出可能な結合親和性を有さない。

40

【 0 0 4 5 】

[00062]「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語は本明細書で使用する場合、例えば抗体と抗原との間等の2つの分子間の非ランダム結合反応を指す。本明細書で提供される抗体および抗原結合断片の結合親和性は、 K_D 値によって表すことができ、 K_D 値は、抗原と抗原結合分子（例えば、抗体および抗原結合断片）との間の結合が平衡に達する場合の解離速度対結合速度の比（ k_{off}/k_{on} ）を表す。抗原結合親和性（例えば、 K_D ）は、例えばBiacore技法（これは、表面プラズモン共鳴技術に基づく、例えば、Murphy, M.ら、Current protocols in prot

50

ein science、Chapter 19、unit 19、14頁、2006年を参照)、Kinexa技法(例えば、Darling, R. J.ら、Assay Drug Dev. Technol.、2(6):647~657頁(2004年)を参照)、およびフローサイトメトリーを含む、当該技術分野で既知の適切な方法を使用して適切に決定され得る。

【0046】

[00063]「結合に関して競合する」能力は本明細書で使用する場合、抗体または抗原結合断片の、任意の検出可能な程度で(例えば、少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%分)2つの分子(例えば、ヒトFGFR2bおよび抗FGFR2b抗体)間の結合相互作用を阻害する能力を指す。過度の実験を伴わずに、所与の抗体が、本開示の抗体(例えば、Ab 36、Ab 36c、またはAb Hu36-2、以下で規定される)とFGFR2bに対する結合に関して競合するかどうかを決定することが可能であることは、当業者に理解されよう。

10

【0047】

[00064]「エピトープ」という用語は本明細書で使用する場合、抗体が結合する抗原上の原子またはアミノ酸の特異的な基を指す。

[00065]アミノ酸配列に関する「保存的置換」は、アミノ酸残基を、類似した生化学的特性を有する側鎖を有する異なるアミノ酸残基で置き換えることを指す。例えば、保存的置換は、疎水性側鎖を有するアミノ酸残基(例えば、Met、Ala、Val、Leu、およびIle)間で、中性親水性側鎖を有する残基(例えば、Cys、Ser、Thr、AsnおよびGln)間で、酸性側鎖を有する残基(例えば、Asp、Glu)間で、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、His、Lys、およびArg)間で、または芳香族側鎖を有する残基(例えば、Trp、Tyr、およびPhe)間で行うことができる。当該技術分野で既知であるように、保存的置換は通常、タンパク質コンホメーション構造において著しい変化を引き起こさず、その結果、タンパク質の生物活性を保持することができる。

20

【0048】

[00066]「相同体」および「相同性」という用語は本明細書で使用する場合、交換可能に使用され、最適にアラインさせた場合に別の配列に対して少なくとも80%(例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%)の配列同一性を有する核酸配列(またはその相補鎖)またはアミノ酸配列を指す。

30

【0049】

[00067]アミノ酸配列(または核酸配列)に関する「配列同一性パーセント(%)」は、最大数の同一アミノ酸(または核酸)を達成するように、配列をアラインさせて、必要に応じて、ギャップを導入した後に参照配列におけるアミノ酸(または核酸)残基に対して同一である候補配列中のアミノ酸(または核酸)残基のパーセントとして定義される。アミノ酸残基の保存的置換は、同一残基であるとみなされてもよく、またはみなされなくてもよい。アラインメントは、アミノ酸(または核酸)配列同一性パーセントを決定する目的で、例えば、BLASTN、BLASTp(アメリカ国立生物工学情報センター(US National Center for Biotechnology Information)(NCBI)のウェブサイトを利用可能、またAltschul S. F.ら、J. Mol. Biol.、215:403~410頁(1990年); Stephen F.ら、Nucleic Acids Res.、25:3389~3402(1997年)も参照)、ClustalW2(欧州バイオインフォマティクス研究所(European Bioinformatics Institute)のウェブサイトを利用可能、またHiggins D. G.ら、Methods in Enzymology、266:383~402頁(1996年); Larkin M. A.ら、Bioinformatics(オックスフォード、イギリス)、23(21):2947~8頁(2007年)も参照)、およびALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソ

40

50

ソフトウェア等の公的に利用可能なツールを使用して達成することができる。当業者は、ツールによって提供されるデフォルトパラメータを使用してもよく、または例えば適切なアルゴリズムを選択すること等によって、必要に応じてアラインメントに関するパラメータをカスタマイズしてもよい。

【0050】

[00068]「単離された」物質は、ヒトの手によって天然状態から変更されている。「単離された」組成物または物質が天然に存在する場合、「単離された」組成物または物質は、その本来の環境から変化もしくは除去されているか、またはその両方である。例えば、生存している動物中に天然で存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されて」おらず、それが実質的に純粋な状態で存在するようにその天然状態の共存している材料から十分に分離された場合に、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されている」。「単離されたポリヌクレオチド配列」は、単離されたポリヌクレオチド分子の配列を指す。ある特定の実施形態において、「単離された抗体」は、電気泳動法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動）、またはクロマトグラフィ法（例えば、イオン交換クロマトグラフィまたは逆相HPLC）によって決定される場合に、少なくとも60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の純度を有する抗体を指す。

10

【0051】

[00069]「エフェクター機能」は本明細書で使用する場合、抗体のFc領域の、C1複合体およびFc受容体等のそのエフェクターに対する結合に起因する生物活性を指す。例示的なエフェクター機能として、抗体とC1複合体上のC1qとの相互作用によって誘導される補体依存性細胞傷害(CDC)；抗体のFc領域の、エフェクター細胞上のFc受容体への結合によって誘導される抗体依存性細胞傷害(ADCC)；およびファゴサイトーシスが挙げられる。

20

【0052】

[00070]「抗体依存性細胞傷害」および「ADCC」は、Fc受容体(FcR)を発現するエフェクター細胞が、標的細胞上の結合された抗体または抗原結合断片を認識して、続いて標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介性反応を指す。「ADCC活性」は、標的細胞上に結合された抗体または抗原結合断片の、上述するようなADCC反応を誘発する能力を指す。

30

【0053】

[00071]「標的細胞」は、Fc領域を含む抗体が、一般的にFc領域に対してC末端であるタンパク質部分を介して特異的に結合する細胞である。「エフェクター細胞」は、1つまたは複数のFc受容体を発現して、エフェクター機能を果たす白血球である。好ましくは、細胞は、少なくともFcRIIIを発現して、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられ、PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、当該技術分野で既知であるように、それらの天然の供給源から、例えば血液またはPBMCから単離され得る。

40

【0054】

[00072]本明細書で使用する場合、「ベクター」は、そこに含有される所望の核酸断片の複製/クローニングを可能にするか、または適切な細胞宿主に導入される場合にかかる所望の核酸断片によってコードされるタンパク質の発現を可能にするポリヌクレオチド分子を指す。ベクターは、クローニングベクターおよび発現ベクターの両方が含まれる。「発現ベクター」という用語は本明細書で使用する場合、タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、当該タンパク質の発現をもたらすように作動可能に挿入され得るビヒクルを指す。発現ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択可能エレメント、およびレポーター遺伝子を含む、発現を制御するための様々なエレメントを含有し得る。さらに、ベクターは複製起点を含有し得る。

50

【 0 0 5 5 】

[00073]「宿主細胞」という語句は本明細書で使用する場合、外因性ポリヌクレオチドおよび/またはベクターが導入された細胞を指す。

[00074]状態を「処置すること」または「処置」は本明細書で使用する場合、状態を防止もしくは軽減すること、状態の発症の開始もしくは速度を緩徐化すること、状態の発症のリスクを低減すること、状態と関連付けられる症状の発症を防止もしくは遅延させること、状態と関連付けられる症状を低減もしくは終了させること、状態の完全もしくは部分的退行をもたらすこと、状態を治癒すること、またはそれらの幾つかの組合せが挙げられる。

【 0 0 5 6 】

[00075]「F G F R 2 b 関連」疾患または状態は本明細書で使用する場合、F G F R 2 b モジュレーターを用いた処置に対して感受性があるか、またはF G F R 2 b の発現もしくは過剰発現と関連付けられる任意の疾患または状態を指す。一部の実施形態において、F G F R 2 b 関連の疾患または状態は、癌、任意選択で、F G F R 2 b の発現または上昇された発現に関して陽性である癌である。

【 0 0 5 7 】

[00076]「癌」は本明細書で使用する場合、悪性細胞成長または新生物、異常増殖、浸潤または転移を特徴とする任意の医学的状态を指し、固形腫瘍および非固形癌の両方を包含する。本明細書で使用する場合、「固形腫瘍」は、腫瘍性および/または悪性細胞の固形塊を指す。「非固形癌」は、白血病、リンパ腫、骨髄腫および他の血液悪性疾患等の血液悪性疾患を指す。癌または腫瘍の例として、血液学的悪性疾患（例えば、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫およびB細胞リンパ腫）、口腔癌（例えば、唇、舌または咽頭の）、消化器（例えば、食道、胃、小腸、結腸、大腸、または直腸）における腫瘍、腹膜、肝臓および胆汁道、膵臓、喉頭または肺（小細胞または非小細胞）等の呼吸器系、骨、結合組織、皮膚（例えば、黒色腫）、胸部、生殖器（卵管、子宮、子宮頸部、精巣、卵巣、または前立腺）、泌尿器（例えば、膀胱または腎臓）、脳および甲状腺等の内分泌腺が挙げられる。ある特定の実施形態において、癌は、卵巣癌、子宮内膜癌、乳癌、肺癌（小細胞または非小細胞）、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、膵癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌（肝癌）、腎細胞癌（腎癌）、頭頸部癌、中皮腫、黒色腫、肉腫、および脳腫瘍（例えば、神経膠芽腫等の神経膠腫）から選択される。

【 0 0 5 8 】

[00077]「薬学的に許容可能な」という用語は、指定の担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤（複数可）、および/または塩が概して、製剤を含む他の成分と化学的および/または物理的に適合性であり、またそれらのレシピエントと生理学的に適合性であることを示す。

【 0 0 5 9 】

[00078]抗F G F R 2 b 抗体

[00079]本開示は、A b 3 6 の1つまたは複数（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、または6個）のC D R 配列を含む抗F G F R 2 b 抗体を提供する。表1は、A b 3 6 のC D R 配列を示す。「A b 3 6」という用語は本明細書で使用する場合、配列番号11の重鎖可変領域、および配列番号13の軽鎖可変領域を有するマウスモノクローナル抗体を指す。A b 3 6 は、F G F R 2 b に特異的に結合する。

【 0 0 6 0 】

[00080]

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1.Ab 36のCDRアミノ酸配列

Ab 36	HCDR1 配列番号 1	HCDR2 配列番号 3	HCDR3 配列番号 5
	GYTFTSYNMH	AIFPENGDTSYNQKFKG	GGFDY
	LCDR1 配列番号 2	LCDR2 配列番号 4	LCDR3 配列番号 6
	KASQDVSTNVA	SASYRYT	QQHYSSPYT

【 0 0 6 2 】

[00081] C D R は、抗原結合に關与すると知られているが、6個の C D R が全て、不可欠または不変であるとは限らないことが見出されている。換言すると、A b 36 における1つまたは複数の C D R を置き換えること、または変更すること、または修飾することが可能であるが、F G F R に対する、特に F G F R 2 b に対する特異的結合親和性を實質的に保持する。

【 0 0 6 3 】

[00082]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、表 1 に提供されるような1つまたは複数の C D R 領域において1つまたは複数の修飾または置換を含み得る。かかる変異体は、それらの親抗体の F G F R 2 b に対する特異的結合親和性を保持するが、より高い抗原結合親和性またはグリコシル化の見込みの低減等の特性の1つまたは複数の改善を有し得る。

【 0 0 6 4 】

[00083]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、C D R 領域内（または可変領域内）の1つまたは複数の A s n または A s p ホットスポットを除去するよう修飾されてもよい。かかる A s n および A s p ホットスポットは、抗体の分解を招く可能性があり、したがって、抗体の安定性を低減させる。C D R 領域内の例示的な推定ホットスポットモチーフとして、A s n - G l y、A s n - T h r、A s n - S e r、A s n - A s n、A s p - G l y、A s p - T h r、A s p - S e r、A s p - A s p、および A s p - H i s が挙げられる。ある特定の実施形態において、H C D R 2 領域内の A s n - A r g は、ホットスポットを除去するために A s n G l y で修飾される。

【 0 0 6 5 】

[00084]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、配列番号 5 の重鎖 C D R 3 配列、および任意選択で、配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 を含む。重鎖 C D R 3 領域は、抗原結合部位の中心に位置し、したがって、抗原と最も多く接触すると考えられ、抗体の、抗原に対する親和性に最も多くの自由エネルギーを提供する。また、重鎖 C D R 3 は、多重多様化メカニズムによる長さ、アミノ酸組成およびコンホメーションの観点から抗原結合部位の群を抜いて多様な C D R であると考えられる（T o n e g a w a S . N a t u r e . 3 0 2 : 5 7 5 ~ 8 1 頁 . (1 9 8 3 年) ）。重鎖 C D R 3 における多様性は、大部分の抗体特異性（X u J L , D a v i s M M . I m m u n i t y . 1 3 : 3 7 ~ 4 5 頁 (2 0 0 0 年) ）ならびに望ましい抗原結合親和性（S c h i e r R , J M o l B i o l . 2 6 3 : 5 5 1 ~ 6 7 頁 (1 9 9 6 年) ）を生み出すのに十分である。

【 0 0 6 6 】

[00085]ある特定の実施形態では、抗体が F G F R 2 b に特異的に結合し得る限りは、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、適切なフレームワーク領域（F R）配列をさらに含む。表 1 で提供される C D R 配列は、マウス抗体から得られるが、表 1 で提供される C D R 配列は、とりわけ組換え技法等の当該技術分野で既知の適切な方法を使用して、マウス、ヒト、ラット、ウサギ等の任意の適切な種の任意の適切な F R 配列にグラフトされ得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

[00086]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、ヒト化されている。本明細書で提供される例示的なヒト化抗体として、A b h u 3 6 - 2 が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

[00087]「A b h u 3 6 - 2」は本明細書で使用する場合、配列番号 7 の重鎖可変領域、および配列番号 9 の軽鎖可変領域を有する、A b 3 6 に基づくヒト化抗体を指す。ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒト免疫グロブリン、任意選択でヒト I g G をさらに含む。一部の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、重鎖および / または軽鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、C H 1、ヒンジ、および / または C H 2 - C H 3 領域を含む。ある特定の実施形態において、重鎖定常領域は、F c 領域を含む。ある特定の実施形態において、軽鎖定常領域は、C または C を含む。

10

【 0 0 6 9 】

[00088]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗 F G F R 2 b 抗体は、マウス可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ抗体である。「A b 3 6 c」は本明細書で使用する場合、それぞれヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域に融合された、配列番号 1 1 のマウス重鎖可変領域、および配列番号 1 3 のマウス軽鎖可変領域を含む、A b 3 6 に基づくキメラ抗体を指す。

【 0 0 7 0 】

[00089]表 2 および表 3 は、例示的な抗体の可変領域配列を示す。

20

[00090]

【 0 0 7 1 】

【表 2】

表2.例示的な抗体の可変領域のアミノ酸配列

Ab hu36-2	V _H (配列番号 7)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWIGAI FPEVDGTSYNQKFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGFDYWGQGTTITVSS
Ab 36/ Ab 36c	V _L (配列番号 9)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTNVAWYQQKPGKAPKLLIF ASYRYTGVPDRFAGSGSGTDFITFTISLQPEDATYYCQQHYSSPYTFGQ GTKLEIK
Ab 36/ Ab 36c	V _H (配列番号 11)
	QPYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAI FPEVDGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR GGFDYWGQGTTITVSS
Ab 36/ Ab 36c	V _L (配列番号 13)
	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTNVAWYQQKPGQSPKLLIF ASYRYTGVPDRFAGSGSGTDFITFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGG GTKLDIK

30

40

【 0 0 7 2 】

[00091]

【 0 0 7 3 】

50

【表 3】

表3.例示的な抗体の可変領域のヌクレオチド配列

Ab hu36-2	V_H : ヌクレオチド配列(配列番号 8)
	<p>caggfgcagctgggagcagcggagccgaggtgaagaagcccggcagcagcgtgaaggfagctgcaaggc cagcggctacacctcaccagctacaacatgcaactgggtgagacaggtcccggacggactggagtgatggc gccatctccccgagaacggcgacacctctacaaccagaagftcaagggcagggccaccatcaccgccgaca gagcaccagcaccgctacatggagctgagcagctaggagcaggacaccgccgtgtactactgcccagagg cgcttcgactactgggacagggcaccaccgtgaccgtgagcagc</p> <p>V_L: ヌクレオチド配列(配列番号 10)</p> <p>gacatccagatgacccagagccctagcagcctgagcggcagcgtggcgacagagtgaccatcacctgcaagg ccagccaggacgtgccaccaacgtggcctgtaccagcagaagcccggcaaggccaagctgctgafctcag cggcagctacaggtacaccggcgtgccagcagatcagcggcagcggaaagcggcaccgactcacctcacca tcagcagcctgcagcccaggacatgccaccatactgccagcagcactacagcagccctacacatfcgcca gggcaccaagctggagatcaag</p>
Ab 36/Ab 36c	<p>V_H: ヌクレオチド配列(配列番号 12)</p> <p>cagcctatctacagcagctctgggctgagctggfaggcctggggcctcagtgagatgctctgcaaggctctgg ctacacatftaccagttacaatgcaactgggtaaagcagacacctagacagggcctggaatggatggagctatftt ccagaaaaatggtgatacttctacaatcagaagftcaagggcaaggccacactgactgtgacaagctccagcac agcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaagactctgcggtctatftctgcaagagggggtttgactactgg ggccaaggcaccactctcagctctca</p> <p>V_L: ヌクレオチド配列(配列番号 14)</p> <p>gacattgtgatgaccagctcacaatcagttccacatcagtaggagacagggfcagatcacctgcaaggccag tcaggatgtgagfactaatgtagcctggatcaaacagaaaccaggacaatctcctaaactactgatttctcggcactct accggtacactggagtcctgatcgtctcggcagtgatctgggacggatcacttccaccatcagcaggtgctc aggctgaagacctggcagtttactgtcaacaacattatagtagtccgtacacgtcggaggggggaccaagctg gacataaaa</p>

10

20

【0074】

[00092]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、
本明細書で提供される1つまたは複数の可変領域配列において1つまたは複数の修飾また
は置換を含有し得るが、FGFR2bに対する特異的結合親和性を保持する。ある特定の
実施形態において、CDR配列、FR配列、または可変領域配列における置換(複数可)
の少なくとも1つ(または全て)は、保存的置換(複数可)を含む。

30

【0075】

[00093]当該技術分野で既知の各種方法を使用して、この目的を達成することができる。
例えば、抗体変異体(例えば、FabまたはscFv変異体)のライブラリーを生成し
て、ファージディスプレイ技術を用いて発現させた後、ヒトFGFR2bに対する結合親
和性に関してスクリーニングすることができる。別の例に関して、コンピューターソフト
ウェアを使用して、抗体の、FGFR2bへの結合をバーチャルでシミュレーションして
、結合界面を形成する抗体上のアミノ酸残基を同定することができる。かかる残基は、結
合親和性の低減を防止するように置換において回避され得るか、またはより強力な結合を
提供するために置換に関して標的とされ得る。

40

【0076】

[00094]ある実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、配列番
号1~配列番号6内の1つまたは複数のCDR配列、および/または1つまたは複数のF
R配列において1つまたは複数のアミノ酸残基置換を含む。ある特定の実施形態において
、合計で10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個、または1個以下の
置換が、CDR配列および/またはFR配列に成される。

【0077】

50

[00095]ある特定の実施形態において、抗FGFR2b抗体は、配列番号1～配列番号6に列挙される配列（単数または複数）に対して少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の配列同一性を有する1個、2個、3個、4個、5個、または6個のCDR配列を含み、その一方で、FGFR2bに対する結合親和性を、その親抗体と類似したレベルまたはさらにはそれよりも高いレベルで保持する。

【0078】

[00096]ある特定の実施形態において、抗FGFR2b抗体は、表2に列挙される配列（単数または複数）に対して少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の配列同一性を有する1つまたは複数の可変領域配列を含み、その一方で、FGFR2bに対する結合親和性を、その親抗体と類似したレベルまたはさらにはそれよりも高いレベルで保持する。一部の実施形態において、総計1個～10個のアミノ酸が、表2において列挙される可変領域配列において置換、挿入、または欠失されている。一部の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、CDRの外側の領域において（例えば、FRにおいて）起こる。

10

【0079】

[00097]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、ADCCまたはCDC等のエフェクター機能を誘導することが可能な定常領域を含む。ADCCおよびCDC等のエフェクター機能は、FGFRを発現する細胞に対する細胞傷害をもたらすことができ、Fc受容体結合アッセイ、C1q結合アッセイ、および細胞溶解アッセイ等の各種アッセイを使用して評価することができる。ある特定の実施形態において、定常領域は、ADCCを誘導することが知られているIgG1アイソタイプを有する。

20

【0080】

[00098]ある特定の実施形態において、抗FGFR2b抗体は、増強されたADCCを付与する定常領域における1つまたは複数の修飾を含む。本明細書で使用する場合、「増強されたADCC」という用語は、上記で規定されるADCCのメカニズムによる、所与の時間で、標的細胞を囲む培地中で所与の濃度の抗体で溶解される標的細胞の数の増加、および/またはADCCのメカニズムによる、所与の時間で所与数の標的細胞の溶解を達成するのに必要とされる標的細胞を囲む培地中での抗体の濃度の低減のいずれかとして定義される。

30

【0081】

[00099]目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号、Hellstromら Proc Natl Acad Sci USA 83,7059～7063頁（1986年）およびHellstromら Proc Natl Acad Sci USA 82,1499～1502頁（1985年）、米国特許第5,821,337号；またはBruggemannら、J Exp Med 166,1351～1361頁（1987年）に記載されるもののような*in vitro* ADCCアッセイが実施され得る。あるいは、非放射性アッセイ法が用いられてもよい（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞傷害アッセイ（Cell Technology社、マウンテンビュー、CA）およびCytotoxic 96（登録商標）非放射性細胞傷害アッセイ（Promega社、マディソン、WI）を参照）。さらに、目的の分子のADCC活性は、*in vivo*で、例えば、Clynesら、PNAS（USA）95:652～656頁（1998年）に開示されるもの等の動物モデルにおいて評価され得る。

40

【0082】

[00100]ADCC増強に関する各種方法は、従来技術で記載されている。例えば、Fc領域におけるアミノ酸残基のサブセットが、下記のアミノ酸残基（EUナンバリングの残基）等のFcRsへの結合に関与することが実証されている：Fc領域における（1）Lys274～Arg301およびTyr407～Arg416（Sarmayら（1

50

984年) Mol. Immunol.、21:43~51頁およびGergelyら(1984年) Biochem. Soc. Trans.、12:739~743頁); (2) Leu234~Ser239、Asp265~Glu269、Asn297~Thr299、およびAla327~Ile332(Sondermannら(2000年) Nature、406:267~273頁)、および(3) T256、K290、S298、E333、K334、A339(Shieldsら(2001年) J. Biol. Chem.、276:6591~6604頁; および米国特許出願公開第2004/0228856号)は、ヒトFcRIIIAへの結合に関与する。上記で列挙したアミノ酸残基は、例えばShieldsら(2001年)、J Biol Chem 9(2)、6591~6604頁において、ADCCアッセイを増強するように突然変異させることができ、Fc変異体T256A、K290A、S298A、E333A、K334A、およびA339Tは、天然の配列と比較した場合にADCC活性を増強することが証明されている。

10

【0083】

[000101]あるいは、増強されたADCC活性は、グリコシル化形態の抗体を操作することによって得られ得る。多数のグリコシル化形態が、エフェクター細胞のFc受容体へのその結合を増強することにより、抗体のADCC活性を増強すると報告されている。種々のグリコシル化形態は、種々の糖類(例えば、フコース等の1つのタイプの糖を欠如するか、またはマンノース等の高レベルの1つのタイプの糖を有する)を用いるか、または種々の構造(例えば、様々な分岐状構造、例えば二分岐(2つの分岐)、三分岐(3つの分岐)または四分岐(4つの分岐)構造)を有する、抗体に結合されたグリカンの幾つかの形態のいずれかを含む。

20

【0084】

[000102]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、糖鎖操作されている。「糖鎖操作された」抗体または抗原結合断片は、その糖鎖操作されていない対応物と比較した場合に、グリコシル化形態の変化である増加もしくは減少されたグリコシル化レベル、またはその両方を有し得る。ある特定の実施形態において、糖鎖操作された抗体は、その操作されていない対応物よりも増強されたADCC活性を示す。一部の実施形態において、増強されたADCC活性は、FGFR2b発現細胞の少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%、または75%よりも高い溶解を特徴とする。

30

【0085】

[000103]抗体は、ペプチド骨格に対する任意の操作(例えば、アミノ酸配列に対する、および/または個々のアミノ酸の側鎖基に対する修飾)、および/または宿主細胞系を通じた翻訳後修飾に対する操作(例えば、グリコシル化パターンに対する修飾)を含む、当該技術分野で既知の方法によって糖鎖操作され得る。抗体のグリコシル化を操作することによってADCC活性を変更させる方法もまた、当該技術分野で記載されており、例えば、Weikertrら(1999) Nature Biotech.、17:116~121頁; Shields R.L.ら(2002年)、J. Biol. Chem.、277:26733~26740頁; Shinkawaraら(2003年)、J Biol Chem.、278、3466~3473; Ferraraら(2006年)、Biotech Bioeng.、93、851~861頁; Yamane-Ohnukiら(2004年)、Biotech Bioeng.、87、614~622頁; Niwaraら(2006年)、J Immunol Methods 306、151~160頁; Shinkawa T.ら、J. Biol. Chem.、(2003年)、278:3466~3473頁を参照されたい。

40

【0086】

[000104]一部の実施形態において、本明細書で提供される糖鎖操作された抗体は、脱フコシル化されている(即ち、フコースを含有しない)。脱フコシル化された(即ち、フコース欠乏性、またはフコシル化されていない)抗体は、FcRIIIに対して増加された結合を示し、したがって、より高いADCC活性を誘発することが、幾つかの研究に

50

より示されている (Shields ら (2002 年) J . Biol . Chem . , 277 : 26733 ~ 26740 頁 ; Shinkawa ら (2003) J . Biol . Chem . , 278 : 3466 ~ 3473 頁 ; および欧州特許出願公開第 1176195 号) 。 一部の実施形態において、本明細書で提供される脱フコシル化された抗体は、重鎖のアスパラギン 297 (Asn 297) (Kabat ナンバリングに基づく) でフコスを欠如している。Asn 297 は、IgG1 アイソタイプの抗体のFc領域の各CH₂ドメインにおいて見出される保存されたN連結グリコシル化部位である (Arnold ら、Glycobiology and Medicine、564 : 27 ~ 43 頁、2005 年) 。

【0087】

[000105] 一部の実施形態において、本明細書で提供される糖鎖操作された抗体は、高マンノースグリコシル化形態 (例えば、マンノース e5、マンノース 7、8、9 グリカン) を特徴とする。高マンノースグリコシル化形態は、ADCC 活性を増強することが証明されている (Yu ら (2012 年)、Landes Bioscience、mAbs 4 : 4、475 ~ 487 頁) 。

10

【0088】

[000106] 一部の実施形態において、本明細書で提供される抗体は、その定常領域内に、a) グリコシル化部位を導入または除去する、b) 遊離システイン残基を導入する、c) 活性化Fc受容体への結合を増強する、および/またはd) ADCCを増強する1つまたは複数の修飾をさらに含む。

【0089】

20

[000107] 抗FGFR2b抗体またはその抗原結合断片は、炭水化物部分 (例えば、オリゴ糖構造) が結合され得る側鎖を有する1つまたは複数のアミノ酸残基を含み得る。抗体のグリコシル化は通常、N連結またはO連結のいずれかである。N連結は、炭水化物部分の、アスパラギン残基、例えば、アスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - トレオニン (式中、X は、プロリンを除く任意のアミノ酸である) 等のトリペプチド配列におけるアスパラギン残基の側鎖への結合を指す。O連結されたグリコシル化は、糖N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つの、ヒドロキシアミノ酸への、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの結合を指す。天然のグリコシル化部位の除去は、例えば、抗体の配列中に存在する上述のトリペプチド配列 (N連結されたグリコシル化部位に関して) またはセリンもしくはトレオニン残基 (O連結されたグリコシル化部位に関して) の1つが置換されるようにアミノ酸配列を変更することによって、利便性よく遂行され得る。新たなグリコシル化部位は、かかるトリペプチド配列またはセリンもしくはトレオニン残基を導入することによって、類似した様式で創出することができる。

30

【0090】

[000108] 本明細書で提供される抗FGFR2b抗体はまた、1つまたは複数の導入された遊離システインアミノ酸残基を含む、システインが操作されている変異体を包含する。遊離システイン残基は、ジスルフィド架橋の一部ではないものである。システインが操作されている変異体は、例えば、操作されているシステインの部位で、例えばマレイミドまたはハロアセチルを通じた細胞傷害性および/または造影用化合物、標識、またはとりわけ放射性同位体とのコンジュゲーションに有用である。遊離システイン残基を導入するように抗体を操作する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、国際公開第2006/034488号を参照されたい。

40

【0091】

[000109] 本明細書で提供される抗FGFR2b抗体はまた、そのFc領域および/またはヒンジ領域で1つまたは複数のアミノ酸残基修飾または置換を含むFc変異体を包含する。ある特定の実施形態において、抗FGFR2b抗体は、新生児Fc受容体 (FcRn) に対するpH依存的結合を改善する1つまたは複数のアミノ酸置換 (複数可) を含む。かかる変異体は、それが輸送用リソソームにおける分解から逃れて、続いて、細胞から移動および放出されるのを可能にする酸性pHでFcRnに結合するため、延長された薬

50

物動態的半減期を有し得る。FcRnとの結合親和性を改善するように抗体およびその抗原結合断片を操作する方法は、当該技術分野で周知されており、例えば、Vaughn, D.ら、Structure、6(1):63~73頁(1998年); Kontermann, R.ら、Antibody Engineering、Volume 1、Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK、Springer社により出版、2010年; Yeung, Y.ら、Cancer Research、70:3269~3277頁(2010年); およびHinton, P.ら、J. Immunology、176:346~356頁(2006年)を参照されたい。

【0092】

[000110]結合特性

[000111]本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、 10^{-6} M以下(例えば、 5×10^{-7} M以下、 2×10^{-7} M以下、 10^{-7} M以下、 5×10^{-8} M以下、 2×10^{-8} M以下、 10^{-8} M以下、 5×10^{-9} M以下、 4×10^{-9} M以下、 3×10^{-9} M以下、 2×10^{-9} M以下、 10^{-9} M以下、 9×10^{-10} M以下、 8×10^{-10} M以下、 7×10^{-10} M以下、 6×10^{-10} M以下、 5×10^{-10} M以下、 4×10^{-10} M以下、 3×10^{-10} M以下、 2.5×10^{-10} M以下、 2×10^{-10} M以下、 1.5×10^{-10} M以下、 10^{-10} M以下、 9×10^{-11} M以下、 5×10^{-11} M以下、 4×10^{-11} M以下、 3×10^{-11} M以下、 2×10^{-11} M以下、または 10^{-11} M以下)の結合親和性(K_D)でFGFR2bに特異的に結合することが可能である。

【0093】

[000112]一部の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、Biacoreによって測定される場合、 5×10^{-9} M以下、 4×10^{-9} M以下、 3×10^{-9} M以下、 2×10^{-9} M以下、 10^{-9} M以下、 5×10^{-10} M以下、 4×10^{-10} M以下、 3×10^{-10} M以下、 2×10^{-10} M以下、 10^{-10} M以下、 5×10^{-11} M以下、または 4×10^{-11} M以下、 3×10^{-11} M以下、 2×10^{-11} M以下の結合親和性(K_D)でヒトFGFR2bに特異的に結合することが可能である。

【0094】

[000113]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体は、カニクイザルFGFR対応物、ラットFGFR対応物、およびマウスFGFR対応物と交差反応する。

【0095】

[000114]抗体の、ヒトFGFR2bへの結合はまた、「最大半数効果濃度」(EC_{50})値によって表すことができ、それは、その最大効果(例えば、結合または阻害等)の50%が観察される抗体の濃度を指す。 EC_{50} 値は、当該技術分野で既知の方法、例えば、ELISA、ウェスタンブロット、フローサイトメトリーアッセイ、および他の結合アッセイ等のサンドイッチアッセイによって測定することができる。ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗体は、ELISAによる5nM以下、4nM以下、3nM以下、2nM以下、1.5nM以下、1nM以下、0.9nM以下、0.8nM以下、0.7nM以下、0.6nM以下、0.5nM以下、0.4nM以下、0.3nM以下、0.2nM以下または0.1nM以下の EC_{50} (即ち、50%結合濃度)でヒトFGFR2bに特異的に結合する。ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗体は、フローサイトメトリーによる10nM以下、9nM以下、8nM以下、7nM以下、6nM以下、5nM以下、4nM以下、3nM以下、2nM以下、1nM以下、0.8nM以下、0.5nM以下または0.3nM以下の EC_{50} (即ち、50%結合濃度)でヒトFGFR2bおよび/またはFGFR1bに特異的に結合する。

【0096】

[000115]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗体は、診断用途および/または治療用途を提供するのに十分であるヒトFGFR2bに対する特異的結合親和性を有する。

10

20

30

40

50

【00097】

[000116]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗体は、ヒトFGFR2bの、そのリガンドへの結合を阻止し、それにより例えばFGFR2b発現細胞の増殖の阻害を含む生物学的活性を提供する。

【00098】

[000117]増殖阻害効果は、「50%成長阻害濃度」(GI₅₀)値によって表すことができ、それは、その最大増殖阻害効果の50%が観察される抗体の濃度を指す。GI₅₀値は、当該技術分野で既知の方法、例えば、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(MTS)比色アッセイ(米国特許第5,185,450号に記載されるものを参照)、臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)アッセイ(Berridgeら Biotechnol Annu Rev. 2005年; 11:127~52頁を参照)、アラマーブルーアッセイ(米国特許第5,501,959号に記載されるものを参照)およびAssay Guidance Manual(Sittampalamら編 2004年)に記載されるような任意の他の方法によって測定することができる。ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗体は、MTSによって測定される場合、15nM以下、14nM以下、13nM以下、12nM以下、11nM以下、10nM以下、9nM以下、8nM以下、7nM以下、6nM以下、5nM以下、2nM以下または1nM以下の50%成長阻害濃度(GI₅₀)でそれらの表面上で発現されるヒトFGFR2bを有する細胞の増殖を阻害することが可能である。

【00099】

[000118]抗原結合断片

[000119]本開示はまた、FGFR2bに特異的に結合することができる抗原結合断片を提供する。様々なタイプの抗原結合断片が当該技術分野で既知であり、例えばCDRおよび可変配列が配列番号1~配列番号6および表2に示される例示的な抗体、および修飾または置換を含有するそれらの種々の変異体を含む、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体に基づいて開発され得る。

【0100】

[000120]ある特定の実施形態において、本明細書で提供される抗FGFR2b抗原結合断片は、ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、単鎖Fv断片(scFv)、scFv二量体、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、Fv断片、Fab、Fab'、F(ab')₂、二特異性抗体、dsダイアボディ、ナノボディ、ドメイン抗体、単ドメイン抗体、または二価ドメイン抗体である。

【0101】

[000121]各種技法が、かかる抗原結合断片の産生に使用され得る。実例となる方法として、インタクトな抗体の酵素的消化(例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107~117頁(1992年);およびBrennanら、Science、229:81頁(1985年)を参照)、大腸菌(E. Coli)等の宿主細胞による組換え発現(例えば、Fab、FvおよびScFv抗体断片に関して)、上記で論述されるようなファージディスプレイライブラリーからのスクリーニング(例えば、ScFvに関して)、およびF(ab')₂断片を形成するための2つのFab'-SH断片の化学的カップリング(Carterら、Bio/Technology 10:163~167頁(1992年))が挙げられる。抗体断片の産生に関する他の技法は、当業者に明らかである。

【0102】

[000122]ある特定の実施形態において、抗原結合断片は、scFvである。scFvの生成は、例えば、国際公開第93/16185号;米国特許第5,571,894号;および同第5,587,458号に記載されている。ScFvは、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかでエフェクタータンパク質に融合されて、融合タンパク質を提供

10

20

30

40

50

し得る（例えば、Antibody Engineering、Borrebaeck 著を参照）。

【0103】

[000123]コンジュゲート

[000124]一部の実施形態において、抗FGFR2b抗体は、コンジュゲート部分をさらに含む。コンジュゲート部分は、本明細書で提供される抗体に連結され得る。コンジュゲート部分は、抗体に結合され得る非タンパク質性または消化性部分である。様々なコンジュゲート部分は、本明細書で提供される抗体に連結され得ると意図される（例えば、「Conjugate Vaccines」、Contributions to Microbiology and Immunology、J.M. Cruse and R.E. Lewis, Jr. (著)、Carger Press社、ニューヨーク、(1989年)を参照)。コンジュゲート部分は、数ある方法の中でも共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、錯体形成、会合、混合または添加によって抗体に連結され得る。

10

【0104】

[000125]ある特定の実施形態において、抗FGFR2b抗体は、リンカーを介して1つまたは複数のコンジュゲートに連結される。ある特定の実施形態において、リンカーは、ヒドラジンリンカー、ジスルフィドリンカー、二官能性リンカー、ジペプチドリンカー、グルクロニドリンカー、またはチオエーテルリンカーである。ある特定の実施形態において、リンカーは、リソソームで切断可能なジペプチド、例えば、バリン-シトルリン(vc)である。

20

【0105】

[000126]コンジュゲート部分は、治療剤（例えば、細胞傷害剤）、放射性同位元素、検出可能な標識（例えば、ランタニド、発光標識、蛍光標識、または酵素-基質標識）、薬物動態的修飾部分、または精製部分（例えば、磁気ビーズまたはナノ粒子）であり得る。

【0106】

[000127]検出可能な標識の例として、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フィコエリトリン、またはテキサスレッド）、酵素-基質標識（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼまたは-D-ガラクトシダーゼ）、放射性同位体、発光標識、発色団部分、ジゴキシゲニン、ビオチン/アビジン、DNA分子または検出用の金が挙げられ得る。

30

【0107】

[000128]放射性同位体の例として、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P および他のランタニドが挙げられ得る。放射性同位体で標識された抗体は、受容体標的造影実験において有用である。

【0108】

[000129]ある特定の実施形態において、薬物動態的修飾部分は、抗体の半減期を増加させるのを助長するクリアランス修飾剤であり得る。実例となる例として、PEG、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体等の水溶性ポリマーが挙げられる。ポリマーは、任意の分子量を有してもよく、分岐状または未分岐状であり得る。抗体に結合されるポリマーの数は多様であってよく、1つよりも多いポリマーが結合される場合、1つよりも多いポリマーは、同じ分子または異なる分子であり得る。

40

【0109】

[000130]ある特定の実施形態において、コンジュゲート部分は、磁気ビーズまたはナノ粒子等の精製部分であり得る。

[000131]抗体-薬物コンジュゲート

50

[000132]ある特定の実施形態において、本明細書で提供されるコンジュゲートは、細胞傷害剤にコンジュゲートされた上記抗 F G F R 2 b 抗体のいずれかを含む抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) である。換言すると、コンジュゲート部分は、細胞傷害剤を含む。
【0110】

[000133]ADCは、例えば、癌の処置における細胞傷害剤の局所送達に有用であり得る。このことにより、細胞傷害剤の、腫瘍への標的送達およびそこでの細胞内蓄積が可能となり、これは、これらのコンジュゲートされていない細胞傷害剤の全身投与が許容できないレベルの毒性を正常細胞にもたらし、また腫瘍細胞が排除されるよう求められ得る場合に特に有用である (Baldwinら、(1986年)、Lancet、603~05頁; Thorpe、(1985年)、Monoclonal Antibodies、84; Pincheraら (著)、Biological And Clinical Applications、475~506頁; Syrigos and Epenetos (1999年)、Anticancer Research 19:605~614頁; Niculescu~Duvaz and Springer (1997年) Adv. Drug Del. Rev. 26:151~172頁; および米国特許第4,975,278号)。

10

【0111】

[000134]「細胞傷害剤」は、癌細胞にとって有害であるか、または癌細胞に損傷を与え得るか、もしくは癌細胞を死滅させ得る任意の作用物質であり得る。ある特定の実施形態において、細胞傷害剤は、任意選択で化学療法剤 (例えば、成長阻害剤、DNAアルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリン結合剤、または他の抗癌薬)、毒素、または高反応性放射性同位元素である。

20

【0112】

[000135]細胞傷害剤の例として、例えばジフテリア毒素、外毒素A鎖 (緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 由来)、リシン、アプリン、モデッシン、アルファ - サルシン、シナアブラギリ (Aleurites fordii)、タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PARI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシ (momordica charantia) 阻害剤、クルシン (curcin)、クロチン、サボンソウ (sapaonaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン (enomycin)、およびトリコテセン類等の大分子細菌毒素および植物毒素が挙げられる (例えば、国際公開第93/21232号を参照)。かかる大分子毒素は、Vitettaら (1987年) Science、238:1098頁に記載されるように、当該技術分野で既知の方法を使用して、本明細書で提供される抗体にコンジュゲートされ得る。

30

【0113】

[000136]細胞傷害剤はまた、ゲルダナマイシン (Mandlerら (2000年) J. our. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573~1581頁; Mandlerら (2002年) Bioconjugate Chem. 13:786~791頁)、マンタンシノイド (EP 1391213号; Liuら、(1996年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618~8623頁)、カリケアミシン (Lodeら (1998年) Cancer Res. 58:2928頁; Hinmanら (1993年) Cancer Res. 53:3336~3342頁)、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトボシド、テノボシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1 - デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシンおよびその類似体、代謝拮抗物質 (例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラピン、5 - フルオロウラシル、ダカルバジン)、アルキル化剤 (例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムス

40

50

チン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス - ジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えば、ダウノルピシン (以前はダウノマイシン) およびドキシルピシン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC))、および有糸分裂阻害剤 (例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)、カリケアミシン、マイタンシノイド、ドラスタイン、アウリスタチン (例えば、モノメチルアウリスタチンE (MMAE) およびモノメチルアウリスタチンF (MMAF))、トリコセセン、およびCC1065、および細胞傷害活性を有するそれらの誘導体等の小分子毒素および化学療法薬であり得る。かかる毒素は、細胞傷害活性を有するそれらの誘導体等の小分子毒素および化学療法薬であり得る。かかる毒素は、例えば、米国特許第7,964,566号; Kline, T.ら、Pharmaceutical Research, 32(11): 3480~3493頁に記載されるように、当該技術分野で既知の方法を使用して、本明細書で提供される抗体にコンジュゲートされ得る。

10

【0114】

[000137]細胞傷害剤はまた、高放射性同位元素であってもよい。例として、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²およびLuの放射性同位元素が挙げられる。放射性同位体の、抗体へのコンジュゲーションの方法は、例えば、適切な配位子試薬を介して、当該技術分野で既知である (例えば、国際公開第94/11026号; Current Protocols in Immunology、第1巻および第2巻、Coligenら、編、Wiley-Interscience、New York、N.Y.、Pubs. (1991年)を参照)。配位子試薬は、放射性同位体金属を結合し得るか、キレート化し得るか、または他の状況では組み合わせ得るキレート配位子を有し、また抗体または抗原結合断片のシステインのチオールと反応性である官能基を有する。例示的なキレート配位子として、DOTA、DOTP、DOTMA、DTPAおよびTETA (Macrocyclics社、ダラス、テキサス州) が挙げられる。

20

【0115】

[000138]ある特定の実施形態において、抗体は、リンカー、例えば、ヒドラジンリンカー、ジスルフィドリンカー、二官能性リンカー、ジペプチドリンカー、グルクロニドリンカー、またはチオエーテルリンカーを介してコンジュゲート部分に結合される。

30

【0116】

[000139]例示的な二官能性リンカーとして、例えば、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、アジプイミド酸ジメチルHCl)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トルエン2,6 - ジイソシアネート)、およびビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1,5 - ジフルオム (difluom) - 2,4 - ジニトロベンゼン) が挙げられる。

40

【0117】

[000140]ある特定の実施形態において、リンカーは、特定の生理学的環境下で切断可能であり、それにより、細胞における細胞傷害剤の放出を促進する。例えば、リンカーは、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカーであり得る (Chariら、Cancer Research 52: 127~131頁 (1992年); 米国特許第5,208,020号)。一部の実施形態において、リンカーは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドま

50

たはペントペプチド等のアミノ酸残基を含み得る。リンカーにおけるアミノ酸残基は、天然アミノ酸残基であり得るか、または天然に存在しないアミノ酸残基であり得る。かかるリンカーの例として、バリン-シトルリン (veまたはval-cit)、アラニン-フェニルアラニン (afまたはala-phen)、グリシン-バリン-シトルリン (gly-val-cit)、グリシン-グリシン-グリシン (gly-gly-gly)、バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル (「vc-PAB」) が挙げられる。アミノ酸リンカー構成成分は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、カテプシンCおよびカテプシンD、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断に関するそれらの選択性で設計および最適化することができる。

【0118】

[000141]ある特定の実施形態において、本明細書で提供されるADCでは、抗体（または抗原結合断片）は、1つまたは複数の細胞傷害剤に、約1対約20、約1対約6、約1対約5、約1対約3、約1対約2、約1対約1、約2対約5、約2対約4、または約3対約4の抗体：剤の比でコンジュゲートされる。

【0119】

[000142]本明細書で提供されるADCは、当該技術分野で既知の任意の適切な方法によって調製され得る。ある特定の実施形態において、抗体の求核性基は、まず二官能性リンカー試薬と反応された後、細胞傷害剤に連結されるか、または逆に、即ち、まず細胞傷害剤の求核性基を二官能性リンカーと反応させた後、抗体に連結させる。

【0120】

[000143]ある特定の実施形態において、細胞傷害剤は、本明細書で提供される抗体の遊離システインのシステインチオールと反応し得るチオール反応性官能基を含有し得る（または含有するよう修飾され得る）。例示的なチオール反応性官能基として、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、ハロアセチル、スクシンイミジルエステル（例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド）、イソチオシアネート、塩化スルホニル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、またはホスホルアミダイトが挙げられる（Haugland、2003年、Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、Molecular Probes, Inc.; Brinkley、1992年、Bioconjugate Chem. 3:2; Garman、1997年、Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach、Academic Press、ロンドン; Means (1990年) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996年) Academic Press、サンディエゴ、40~55頁、643~671頁）。

【0121】

[000144]細胞傷害剤または抗体は、リンカー試薬と反応した後、コンジュゲートされて、ADCを形成し得る。例えば、細胞傷害剤のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (NHS) は、実施され、単離され、精製され、および/もしくは特徴付けられ得るか、または細胞傷害剤のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (NHS) は、原位置で形成されて、抗体の求核性基と反応され得る。

【0122】

[000145]一部の実施形態において、細胞傷害剤および抗体は、原位置での活性化および反応によって連結されて、一工程でADCを形成し得る。別の例では、抗体は、ピオチンにコンジュゲートされた後、アビジンにコンジュゲートされる第2のコンジュゲートに間接的にコンジュゲートされ得る。

【0123】

[000146]ある特定の実施形態において、コンジュゲート部分は、抗体における特定のタイプの表面に露出されたアミノ酸残基、例えば、システイン残基またはリジン残基に無作為に結合される。

10

20

30

40

50

【0124】

[000147]ある特定の実施形態において、コンジュゲート部分は、明確に規定された部位に結合されて、薬物対抗体比(DAR)および結合部位に関して高い均質性およびバッチ間の一貫性を有するADC集団を提供する。ある特定の実施形態において、コンジュゲート部分は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、短鎖ペプチドタグ、またはAsn297グリカンを通じて抗体分子における明確に規定された部位に結合される。例えば、コンジュゲーションは、エピトープ結合部分の外側の特定の部位に存在し得る。

【0125】

[000148]部位特異的結合は、抗体の特定の部位にある天然のアミノ酸を、薬物部分がコンジュゲートされ得るシステイン等のアミノ酸と置換することによって、または抗体の特定の部位の前/後に、薬物部分がコンジュゲートされ得るシステイン等のアミノ酸を導入することによって達成され得る(例えば、Stimmelら(2000年)、JBC、275(39):30445~30450頁;Junutulaら(2008年)、Nature Biotechnology、26(8):925~932頁;および国際公開第2006/065533号を参照)。あるいは、部位特異的コンジュゲーションは、Axupら((2012年)、Proc Natl Acad Sci USA、109(40):16101~16116頁)に記載されるように、抗体をそれらの重鎖および/または軽鎖における特定の部位にて、非天然アミノ酸(例えば、p-アセチルフェニルアラニン(pAcF)、N6-(2-アジドエトキシ)カルボニル)-L-リジン、p-アジドメチル-L-フェニルアラニン(pAMF)、およびセレノシステイン(SeC))を含有するよう操作することによって達成されてもよく、ここで、非天然アミノ酸は、オルトゴナル化学がリンカー試薬および薬物を結合するよう設計され得るといふさらなる利点を提供する。2つの上述の部位特異的コンジュゲーション法において有用な例示的な特定の部位(例えば、軽鎖V205、重鎖A114、S239、H274、Q295、S396等)は、多くの先行技術、例えば、Stropら(2013年)、Chemistry & Biology、20、161~167頁;Qun Zhou(2017年)、Biomedicines、5、64;Dimasiら(2017年)、Mol. Pharm.、14、1501~1516頁;国際公開第2013/093809号および国際公開第2011/005481号に記載されている。別の部位特異的ADCコンジュゲーション法は、グリカン媒介性コンジュゲーションであり、そこでは、比較的疎水性の細胞傷害剤を、抗体のアミノ酸骨格にカップリングする代わりに、薬物-リンカーが、CH2ドメイン中に位置されるAsn297グリカン(例えば、フコース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、シアル酸)にコンジュゲートされ得る。また、特有の短鎖ペプチドタグ(例えば、LLQG、LPETG、LCxPxR)を、特定の部位(例えば、N末端またはC末端領域における部位)を通じて抗体に導入する試みが成されており、続いてそれにより、ペプチドタグ中の特定のアミノ酸を官能化して、薬物-リンカーにカップリングさせることが可能になる(Stropら(2013年)、Chemistry & Biology、20、161~167頁;Beerliら(2015年)、PLoS ONE、10、e0131177;Wuら(2009年)、Proc. Natl. Acad. Sci.、106、3000~3005頁;Rabuka(2012年)、Nat. Protoc.、7、1052~1067頁)。

【0126】

[000149]ポリヌクレオチドおよび組換え法

[000150]本開示は、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0127】

[000151]「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用する場合、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)および一本鎖または二本鎖形態のいずれかのそれらのポリマーを指す。特に限定されない限りは、当該用語は、参照核酸として類似した結合特性を有し、かつ天然に存在するヌクレオチドに類似した様式で代謝される天然ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドの既知の類似体を含有するポリヌクレオチドを包含する。別記されない限り、特定のポリヌクレオチド配列はまた、それらの保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補配列ならびに明確に示された配列を含蓄する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る（Batzera, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991年); Ohtsuka, *J. Biol. Chem.* 260:2605~2608頁 (1985年); および Rossolini, *Mol. Cell. Probes* 8:91~98頁 (1994年) を参照)。

【0128】

[000152]ある特定の実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14で示されるような1つまたは複数のヌクレオチド配列、および/または少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の配列同一性を有するその相同配列、および/または唯一の縮重置換を有するその変異体を含み、本明細書で提供される例示的な抗体の変領域をコードする。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離および配列決定される。コードDNAはまた、合成法によって得られ得る。

【0129】

[000153]抗FGFR2b抗体（例えば、表3に示されるような配列を含む）をコードする単離されたポリヌクレオチドは、当該技術分野で既知の組換え技法を使用して、さらなるクローニング（DNAの増幅）用または発現用のベクターに挿入され得る。多くのベクターが利用可能である。ベクター構成成分として概して、下記の：シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1）、および転写終結配列の1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターはまた、ウイルス粒子、リポソーム、またはタンパク質コーティングを含むがこれらに限定されない、細胞へのその進入を助長する材料を含み得る。

【0130】

[000154]本開示は、抗体をコードする本明細書で提供される核酸配列、核酸配列に作動可能に連結される少なくとも1つのプロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1）、および少なくとも1つの選択マーカーを含有するベクター（例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター）を提供する。ベクターの例として、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来の人工染色体（PAC）等の人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージ等のバクテリオファージ、および動物ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターとして使用される動物ウイルスのカテゴリーとして、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、およびパポウイルス（例えば、SV40）が挙げられる。例示的なプラスミドとして、pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivect、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、p

10

20

30

40

50

EF - B o s 等が挙げられる。

【0131】

[000155]抗体または抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターは、クローニングまたは遺伝子発現用の宿主細胞に導入され得る。本明細書におけるベクター中でDNAをクローニングまたは発現するのに適した宿主細胞は、原核生物、酵母、または上述のより高等の真核生物細胞である。この目的に適した原核生物として、グラム陰性またはグラム陽性生物等の真正細菌 (eubacteria)、例えば、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae)、例えばエシェリキア属 (Escherichia)、例えば大腸菌 (E. coli)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、エルウィニア属 (Erwinia)、クレブシエラ属 (Klebsiella)、プロテウス属 (Proteus)、サルモネラ属 (Salmonella)、例えばサルモネラ・チフィリウム (Salmonella typhimurium)、セラチア属 (Serratia)、例えばセラチア・マルセッセンス (Serratia marcescans)、および赤痢菌属 (Shigella)、ならびにバシラス属 (Bacilli)、例えば枯草菌 (B. subtilis) およびバシラス・リケニフォルミス (B. licheniformis)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、例えば緑膿菌 (P. aeruginosa)、ならびにストレプトマイセス属 (Streptomyces) が挙げられる。

10

【0132】

[000156]原核生物に加えて、糸状菌 (filamentous fungi) または酵母等の真核生物の微生物は、抗FGFR2b抗体をコードするベクター用の適切なクローニングまたは発現宿主である。サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) または一般的なパン酵母は、より低級の真核生物宿主微生物の中で最も一般的に使用される。しかしながら、分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe) ; 例えばK.ラクティス (K. lactis)、K.フラジリス (K. fragilis) (ATCC 12,424)、K.ブルガリクス (K. bulgaricus) (ATCC 16,045)、K.ウィッカーハミイ (K. wickerhamii) (ATCC 24,178)、K.ワルチイ (K. waltii) (ATCC 56,500)、K.ドロソフィラルム (K. drosophilum) (ATCC 36,906)、K.サーモトレランス (K. thermotolerans)、およびK.マルキサヌス (K. marxianus) 等のクルイベロミセス属 (Kluyveromyces) 宿主; ヤロウイア属 (Yarrowia) (欧州特許第402,226号); ピキア・パストリス (Pichia pastoris) (欧州特許第183,070号); カンジダ属 (Candida); トリコデルマ・レーシア (Trichoderma reesia) (欧州特許第244,234号); アカパンカビ (Neurospora crassa); シュワニオミセス属 (Schwanniomyces)、例えばシュワニオミセス・オクシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis); ならびに例えばニューロスポラ属 (Neurospora)、ペニシリウム属 (Penicillium)、トリポクラジウム属 (Tolyposcladium)、およびアスペルギルス属 (Aspergillus) 宿主、例えばA. ニュデランス (A. nidulans) およびA. ニガー (A. niger) 等の糸状菌等の多数の他の属、種、および株が一般に利用可能であり、本明細書で有用である。

20

30

40

【0133】

[000157]本明細書で提供される抗体または抗原断片の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例として、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株および変異体ならびにツマジロクサヨトウ (Spodoptera frugiperda) (イモムシ)、セッタイシマカ (Aedes aegypti) (蚊)、ヒトスジシマカ (Aedes albopictus) (蚊)、キイロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) (ミバエ)、およびカイコ (Bombyx mori) 等の宿主由来の相当する許容昆虫宿主細胞が同定され

50

ている。トランスフェクション用の様々なウイルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPV の L - 1 変異体およびカイコ NPV の Bm - 5 株が公的に利用可能であり、かかるウイルスは、本発明による本明細書におけるウイルスとして、特にツマジロクサヨトウ細胞のトランスフェクション用に使用され得る。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。

【0134】

[000158]しかしながら、脊椎動物細胞に最も興味が集まり、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖が、日常的な手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 系 (COS - 7、ATCC CRL 1651) ; ヒト胎児腎系 (293 細胞または浮遊培養における成長用にサブクローニングした 293 細胞、Grahamら、*J. Gen. Virol.* 36 : 59 頁 (1977 年)) ; ベビーハムスター腎細胞 (BHK、ATCC CCL 10) ; マウス骨髄腫細胞系 (NS0、GalfreおよびMilstein (1981 年)、*Methods in Enzymology*, 73 : 3 ~ 46 頁 ; Sp2 / 0 - Ag14、ATCC CRL - 1581)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Urlaubら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 4216 頁 (1980 年)) ; マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、*Biol. Reprod.* 23 : 243 ~ 251 頁 (1980 年)) ; サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎細胞 (VERO - 76、ATCC CRL - 1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2) ; イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞 (Hep G2、HB 8065) ; マウス乳房腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51) ; TRI 細胞 (Matherら、*Annals N. Y. Acad. Sci.* 383 : 44 ~ 68 頁 (1982 年)) ; MRC 5 細胞 ; FS4 細胞 ; およびヒト肝細胞癌系 (Hep G2) である。一部の好適な実施形態において、宿主細胞は、CHO 細胞、BHK 細胞、または NS0 細胞等の哺乳動物培養細胞である。

【0135】

[000159]一部の実施形態において、宿主細胞は、糖鎖操作された抗体を産生することが可能である。例えば、宿主細胞系は、翻訳後修飾中に所要のグリコシル化機構を提供することができる。かかる宿主細胞系の例として、グルコサミニルトランスフェラーゼ (例えば、(1, 4) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnT III))、グルコシルトランスフェラーゼ (例えば、(1, 4) - ガラクトシルトランスフェラーゼ (GT))、シアリルトランスフェラーゼ (例えば、(2, 3) - シアリルトランスフェラーゼ (ST))、マンノシダーゼ (例えば、マンノシダーゼ II (Man II))、フコシルトランスフェラーゼ (例えば、アルファ - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (FUT8)、(1, 3) フコシルトランスフェラーゼ)、原核生物 GDP - 6 - デオキシ - D - リキソ - 4 - ヘキスロースレダクターゼ (RMD)、GDP - フコーストランスポーター (GFT) 等の、天然に、または遺伝子操作を通じてグリコシル化関連酵素の変更された (増加または減少した) 活性を有するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0136】

[000160]一部の実施形態において、宿主細胞は、機能性 FUT8 の欠如、異種 GnT III の過剰発現、原核生物 GDP - 6 - デオキシ - D - リキソ - 4 - ヘキスロースレダクターゼ (RMD) の発現、または機能性 GFT の欠如を特徴とする。FUT8 ノックアウト宿主細胞系は、フコシル化欠損であり、脱フコシル化された抗体を産生する。宿主細胞系における GnT III の過剰発現 (例えば、Roche 社による Glycart 技術を参照) は、抗体の分割されたフコシル化されていないグリコシル化形態の形成をもたらす。RMD の発現 (例えば、ProBioGen AG 社の Glymax X (登録商標))

10

20

30

40

50

系で見られるような)は、フコースデノボ生合成を阻害して、結果として、かかる宿主細胞系によって生成される抗体もまた、フコシル化の低減を示す。CHO細胞系におけるGFTロックアウト(例えば、Beijing Mabworks Biotech社による技術を参照)は、フコースデノボ生合成経路およびフコースサルベージ生合成経路の両方を阻止して、フコシル化の低減をもたらす。

【0137】

[000161]宿主細胞は、抗FGFR2b抗体産生用の上述の発現またはクローニングベクターで形質転換されて、必要に応じてプロモーターを導入するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するように修飾された従来の栄養培地中で培養される。別の実施形態において、抗体は、当該技術分野において既知の相同組換えによって産生され得る。

10

【0138】

[000162]本明細書で提供される抗体を産生するのに使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養され得る。HamのF10(Sigma社)、最小必須培地(MEM)(Sigma社)、RPMI-1640(Sigma社)、およびダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、Sigma社)等の市販の培地は、宿主細胞を培養するのに適している。さらに、Hamら、Meth.Enz.58:44頁(1979年)、Barnesら、Anal.Biochem.102:255頁(1980年)、米国特許第4,767,704号;同第4,657,866号;同第4,927,762号;同第4,560,655号;または同第5,122,469号;国際公開第90/03430号;国際公開第87/00195号;または米国特許再発行第30,985号に記載される培地のいずれも、宿主細胞用の培養培地として使用され得る。これらの培地はいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の増殖因子(例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子)、塩(例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、およびリン酸塩)、緩衝液(例えば、HEPES)、ヌクレオチド(例えば、アデノシンおよびチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN(商標)薬)、微量元素(ミリモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物と定義される)、およびグルコースまたは同等のエネルギー供給源で補充されてもよい。任意の他の必要なサプリメントもまた、当業者に既知の適切な濃度で含まれ得る。温度、pH等の培養条件は、発現に関して選択される宿主細胞を用いる場合にこれまで使用されたものであり、当業者に明らかである。

20

30

【0139】

[000163]組換え技法を使用する場合、抗体は、細胞内で、細胞周辺腔で産生され得るか、または培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、第1の工程として、宿主細胞または溶解された断片のいずれかの粒子状細片が、例えば遠心分離または超遠心分離によって除去される。Carterら、Bio/Technology 10:163~167頁(1992年)は、大腸菌の細胞周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡潔に述べると、細胞ペーストは、酢酸ナトリウム(pH3.5)、EDTA、およびフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)の存在下で約30分かけて解凍される。細胞細片は、遠心分離によって除去され得る。抗体が培地に分泌される場合、かかる発現系由来の上清は概して、まず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon超遠心分離ユニットを使用して濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、PMSF等のプロテアーゼ阻害剤が先述の工程のいずれかにおいて含まれてもよく、不定の汚染菌の成長を防止するために、抗生物質が含まれてもよい。

40

【0140】

[000164]細胞から調製される抗FGFR2b抗体は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィ、硫酸アンモニウム沈殿、塩析、およびアフィニティクロマトグラフィを使用して精製することができ、アフィニティクロマトグラフィが、好ましい精製技法である。

【0141】

50

[000165]ある特定の実施形態において、固相上に固定化されたプロテインAは、抗体およびその抗原結合断片の免疫親和性精製に使用される。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒトガンマ1、ガンマ2、またはガンマ4重鎖に基づく抗体を精製するのに使用することができる(Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62: 1~13頁(1983年))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプに、およびヒトガンマ3に対して推奨される(Gussら、EMBO J. 5: 1567~1575頁(1986年))。親和性リガンドが結合されるマトリックスは、最も多くの場合アガロースであるが、他のマトリックスが利用可能である。制御多孔質ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリックスは、アガロースを用いて達成され得るより迅速な流速およびより短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J. T. Baker社、フィリップスバーグ、N. J.)が精製に有用である。イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィ、ヘパリンSEPHAROSE(商標)上でのクロマトグラフィ、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂(例えば、ポリアスパラギン酸カラム)上でのクロマトグラフィ、等電点電気泳動(chromatofocusing)、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿等のタンパク質精製に関する他の技法もまた、回収されるべき抗体に応じて利用可能である。

10

【0142】

[000166]任意の予備精製工程(複数可)後に、目的の抗体および汚染物を含む混合物は、約2.5~4.5のpHの溶出緩衝液を使用した低pH疎水性相互作用クロマトグラフィに付されてもよく、好ましくは、低塩濃度(例えば、約0~0.025Mの塩)で実施され得る。

20

【0143】

[000167]医薬組成物

[000168]本開示はさらに、本明細書で提供される抗FGFR2b抗体および1つまたは複数の薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0144】

[000169]本明細書に開示される医薬組成物における使用のための薬学的に許容可能な担体として、例えば、薬学的に許容可能な液体、ゲル、または固体担体、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、緩衝液、酸化防止剤、麻酔薬、懸濁化/分散剤、封鎖またはキレート剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または無毒性補助物質、当該技術分野で既知の他の構成成分、またはそれらの各種組合せが挙げられ得る。

30

【0145】

[000170]適切な構成成分として、例えば、酸化防止剤、充填剤、結合剤、崩壊剤、緩衝液、防腐剤、潤滑剤、香味料、増粘剤、着色剤、乳化剤または糖およびシクロデキストリン等の安定剤が挙げられ得る。適切な酸化防止剤として、例えば、メチオニン、アルコールピン酸、EDTA、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、チオグリセロール、チオグリコール酸、チオソルビトール、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、および/または没食子酸プロピルが挙げられ得る。本明細書に開示される場合、本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片およびコンジュゲートを含む組成物中にメチオニン等の1つまたは複数の酸化防止剤を含むことにより、抗体または抗原結合断片の酸化が減少される。この酸化の低減は、結合親和性の損失を防止または低減して、それにより抗体安定性を改善し、品質保持期限を最大限にする。したがって、ある特定の実施形態において、本明細書に開示されるような1つまたは複数の抗体およびメチオニン等の1つまたは複数の酸化防止剤を含む組成物が提供される。さらに、抗体または抗原結合断片を、1つまたは複数の、メチオニン等の酸化防止剤と混合することによって、本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片の酸化防止する方法、本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片の品質保持期限を延ばす方法、および/または本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片の有効性を改善

40

50

する方法が提供される。

【0146】

[000171]さらに説明するために、薬学的に許容可能な担体として、例えば、塩化ナトリウム注射、リンゲル注射、等張性デキストロース注射、滅菌水注射、またはデキストロースおよび乳酸化リンゲル注射等の水性ビヒクル、植物由来の固定油、綿実油、コーン油、ゴマ油、または落花生油等の非水性ビヒクル、静菌または静真菌濃度の抗菌剤、塩化ナトリウムまたはデキストロース等の等張剤、リン酸またはクエン酸緩衝液等の緩衝液、重硫酸ナトリウム等の酸化防止剤、プロカイン塩酸塩等の局所麻酔薬、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン等の懸濁化剤および分散剤、Polysorbate 80 (TWEEN-80)等の乳化剤、EDTA (エチレンジアミン四酢酸)もしくはEGTA (エチレングリコール四酢酸)等の封鎖剤またはキレート剤、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、または乳酸が挙げられ得る。フェノールまたはクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルおよびプロピル p - ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンズアルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムを含む担体として利用される抗菌剤は、複数回投薬容器中で医薬組成物に添加され得る。適切な賦形剤として、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、またはエタノールが挙げられ得る。適切な無毒性補助物質として、例えば、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解度増強薬、または酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、またはシクロデキストリン等の作用物質が挙げられ得る。

10

20

【0147】

[000172]医薬組成物は、液体溶液、懸濁液、エマルジョン、丸剤、カプセル、錠剤、徐放製剤、または粉末であり得る。経口製剤として、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、ナトリウムサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウム等の医薬品グレード等の標準的な担体が挙げられ得る。

【0148】

[000173]ある特定の実施形態において、医薬組成物は、注射可能組成物に製剤化される。注射可能な医薬組成物は、例えば液体溶液、懸濁液、エマルジョン、または液体溶液、懸濁液、もしくはエマルジョンを生成するのに適した固体形態等の任意の従来の形態で調製され得る。注射用の調製物として、即注射可能な滅菌および/または非発熱性溶液、皮下錠剤を含む使用直前に溶媒と即組み合わせられる凍結乾燥粉末等の滅菌乾燥可溶性生成物、即注射可能な滅菌懸濁液、使用直前にビヒクルと即組み合わせられる滅菌乾燥不溶性生成物、ならびに滅菌および/または非発熱性エマルジョンが挙げられ得る。溶液は、水性または非水性のいずれかであり得る。

30

【0149】

[000174]ある特定の実施形態において、単位用量の非経口調製物は、アンプル、バイアルまたは針付きのシリンジ中に包装される。当該技術分野で既知であり、また実践されているように、非経口投与用の調製物は全て、滅菌かつ非発熱性であるべきである。

【0150】

[000175]ある特定の実施形態において、滅菌凍結乾燥粉末は、本明細書に開示されるような抗体または抗原結合断片を適切な溶媒中に溶解させることによって調製される。溶媒は、粉末もしくは粉末から調製される再構成溶液の安定性または他の薬理学的構成要素を改善する賦形剤を含有し得る。使用され得る賦形剤として、水、デキストロース、ソルビタール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロースまたは他の適切な作用物質が挙げられるが、これらに限定されない。溶媒は、一実施形態においてほぼ中性pHの、クエン酸塩、リン酸ナトリウムもしくはカリウムまたは当業者に既知の他のかかる緩衝液等の緩衝液を含有し得る。続いて、当業者に既知の標準的条件下での溶液の滅菌ろ過、続く凍結乾燥により望ましい製剤が提供される。一実施形態において、得られた溶液は、凍結乾燥用のバイアルに分配される。各バイアルは、抗F

40

50

G F R 2 b 抗体またはその組成物の単回投与量または複数回投与量を含有し得る。用量または1組の用量に必要なとされる量を上回る(例えば、約10%)少量でバイアルを過充填することは、正確な試料引き抜きおよび正確な投薬を促進するために許容可能である。凍結乾燥粉末は、適切な条件下で、例えば約4 ~ 室温で保管され得る。

【0151】

[000176]凍結乾燥粉末の、注射用の水による再構成は、非経口投与における使用のための製剤を提供する。一実施形態において、再構成に関して、滅菌および/または非発熱性の水または他液体の適切な担体は、凍結乾燥粉末に添加される。正確な量は、施される選択された治療法に依存し、経験的に決定され得る。

【0152】

[000177]使用方法

[000178]本開示は、治療有効量の本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片を、それを必要とする対象に投与し、それによりF G F R 2 b 関連状態または障害を処置または防止する工程を含む治療方法を提供する。一部の実施形態において、F G F R 2 b 関連状態または障害は癌であり、任意選択で、癌は、F G F R 2 b を発現または過剰発現することを特徴とする。

【0153】

[000179]癌の例として、卵巣癌、子宮内膜癌、乳癌、肺癌(小細胞または非小細胞)、結腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、膵癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌(肝癌)、腎細胞癌(腎癌)、頭頸部癌、中皮腫、黒色腫、肉腫、および脳腫瘍(例えば、神経膠芽腫等の神経膠腫)、および血液学的悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0154】

[000180]一部の実施形態において、F G F R 2 b 関連状態または障害は、F G F R 2 b を発現または過剰発現することを特徴とする癌である。発現または過剰発現は、診断または予後アッセイにおいて、対象由来の生物学的試料(例えば、癌細胞もしくは組織、または腫瘍浸潤免疫細胞に由来する試料)中のF G F R 2 b のレベルの増加を評価することによって決定され得る。各種方法が使用され得る。例えば、診断または予後アッセイは、細胞の表面上に存在するF G F R 2 b の発現レベルを評価するのに使用され得る(例えば、免疫組織化学アッセイ; I H C を介して)。あるいは、またはさらに、例えば、蛍光 *i n s i t u* ハイブリダイゼーション(F I S H、1998年10月に公開された国際公開第98/45479号を参照)、サザンブロッティング、またはリアルタイム定量的P C R (R T - P C R) 等のポリメラーゼ連鎖反応(P C R) (M e t h o d s 132: 73 ~ 80頁(1990年)) 技法を介して、細胞中のF G F R コード核酸のレベルを測定し得る。上記アッセイの他に、各種 *i n v i v o* アッセイが当業者に利用可能である。例えば、患者の体内の細胞を、検出可能標識、例えば放射性同位元素で任意選択に標識される抗体に曝露させてもよく、抗体の、患者における細胞への結合は、例えば放射能に関して外部スキャンすることによって、または抗体に予め曝露された患者から採取したバイオプシーを分析することによって評価することができる。

【0155】

[000181]治療有効量の本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片は、例えば対象の体重、年齢、既往歴、現在の薬物療法、健康状態ならびに交差反応、アレルギー、感受性および有害な副作用の可能性、ならびに投与経路および疾患発症の程度等の当該技術分野で既知の各種要因に依存する。投与量は、これらのおよび他の状況または要件によって示されるように当業者(例えば、医師または獣医)によって比例的に低減または増加され得る。

【0156】

[000182]ある特定の実施形態において、本明細書で提供されるような抗体または抗原結合断片は、約0.01mg/kg ~ 約100mg/kg の治療有効投与量で投与され得る。これらの実施形態の幾つかにおいて、抗体または抗原結合断片は、約50mg/kg またはそれ未満の投与量で投与され、これらの実施形態の幾つかにおいて、投与量は、1

10

20

30

40

50

0 mg / kg またはそれ未満、5 mg / kg またはそれ未満、3 mg / kg またはそれ未満、1 mg / kg またはそれ未満、0.5 mg / kg またはそれ未満、または 0.1 mg / kg またはそれ未満である。ある特定の実施形態において、投与の投与量は、処置の間に変化し得る。例えば、ある特定の実施形態において、初期投与の投与量は、続く投与の投与量よりも高い場合がある。ある特定の実施形態において、投与の投与量は、対象の反応に応じた処置の間にわたって変動し得る。

【0157】

[000183]投与量レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整され得る。例えば、単回用量が投与されてもよく、または幾つかの分割用量が、時間をかけて投与されてもよい。

10

【0158】

[000184]本明細書に開示される抗体は、例えば非経口（例えば、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注入を含む静脈内注射、筋内注射または皮内注射）または非経口でない（例えば、経口、鼻腔内、眼内、舌下、直腸または局所）経路等の当該技術分野で既知の任意の経路によって投与され得る。

【0159】

[000185]幾つかの実施形態において、本明細書に開示される抗体は、単独で、または1つもしくは複数のさらなる治療手段もしくは治療剤と組み合わせて投与され得る。例えば、本明細書に開示される抗体は、別の治療剤、例えば化学療法剤または抗癌薬と組み合わせて投与され得る。

20

【0160】

[000186]これらの実施形態の幾つかにおいて、1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて投与される本明細書に開示されるような抗体または抗原結合断片は、1つまたは複数のさらなる治療剤と同時に投与されてもよく、これらの実施形態の幾つかにおいて、抗体または抗原結合断片およびさらなる治療剤（複数可）は、同じ医薬組成物の一部として投与されてもよい。しかしながら、別の治療剤と「組み合わせて」投与される抗体または抗原結合断片は、剤と同時に、または剤と同じ組成物中で投与される必要はない。別の剤の前または後に投与される抗体または抗原結合断片は、抗体または抗原結合断片および第2の剤が異なる経路を介して投与される場合でも、その語句が本明細書で使用される場合、当該剤と「組み合わせて」投与されるとみなされる。可能であれば、本明細書に開示される抗体と組み合わせて投与されるさらなる治療剤は、さらなる治療剤の製品情報シートに列挙されるスケジュールに従って、または Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference、第57版; Medical Economics Company社; ISBN: 1563634457; 第57版(2002年11月)) または当該技術分野で周知のプロトコールに従って投与される。

30

【0161】

[000187]本開示は、さらに抗FGFR2b抗体を使用する方法を提供する。

[000188]一部の実施形態において、本開示は、試料中のFGFR2bの存在または量を検出する方法であって、試料を抗体と接触させる工程と、試料中のFGFR2bの存在または量を決定する工程とを含む、方法を提供する。

40

【0162】

[000189]一部の実施形態において、本開示は、対象においてFGFR2b関連疾患または状態を診断する方法であって、a) 対象から得られる試料を、本明細書で提供される抗体と接触させる工程と、b) 試料中のFGFR2bの存在または量を決定する工程と、c) FGFR2bの存在または量を、対象におけるFGFR2b関連疾患または状態の実在または状況と関連させる工程とを含む方法を提供する。

【0163】

[000190]一部の実施形態において、本開示は、対象においてFGFR2b関連疾患または状態を予後判定する方法であって、a) 対象から得られる試料を、本明細書で提供さ

50

れる抗体と接触させる工程と、b) 試料中のFGFR2bの存在または量を決定する工程と、c) FGFR2bの存在または量を、対象の、FGFR2bアンタゴニストに対する潜在的応答性と相関させる工程とを含む、方法を提供する。

【0164】

[000191] 一部の実施形態において、本開示は、任意選択で検出可能な部分とコンジュゲートされた、本明細書で提供される抗体を含むキットを提供する。キットは、FGFR2bの検出またはFGFR2b関連疾患の診断に有用であり得る。

【0165】

[000192] 一部の実施形態において、本開示は、対象においてFGFR2b発現の調節から利益を受ける疾患または状態を処置するための薬剤の製造における、FGFR2b関連疾患または状態を診断/予後判定するための診断/予後試薬の製造における、本明細書で提供される抗体の使用を提供する。

10

【0166】

[000193] 下記の実施例は、特許請求される本発明をより良好に説明するために提供され、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。以下で記載される特定の組成物、材料、および方法は全て、全体的にまたは部分的に、本発明の範囲の範疇に収まる。これらの特定の組成物、材料、および方法は、本発明を限定すると意図されず、単に本発明の範囲の範疇に収まる特定の実施形態を説明するに過ぎない。当業者は、本発明能力を行使せずに、また本発明の範囲を逸脱することなく、等価な組成物、材料、および方法を開発し得る。依然として本発明の限界内に留まりながら、本明細書に記載される手順において多くの変形が成され得ることを理解されよう。かかる変形が本発明の範囲内に包含されることは、本発明者らの意向である。

20

【実施例】

【0167】

実施例1

細胞および試薬

[000194] FGFR2b発現を伴うヒト胃癌細胞系KATO IIIおよびSNU16、ならびにBa/F3細胞(プレBリンパ球)は、American Type Culture Collection(ATCC)から購入した。ヒト食道癌細胞系KYSE180は、北京大学から寄贈された。上述のヒト細胞系は、供給元の推奨に従って培養した。ヒト肺癌患者由来異種移植片モデルLC038を開発するのに使用されるヒト腫瘍組織は、規則に沿って患者の同意を得てZhongshan病院(中国)から入手し、ヒト肺癌患者由来異種移植片モデルLC038を開発するのに使用した。

30

【0168】

[000195] 抗体生成期間中の抗体スクリーニング用の細胞ベースのアッセイを樹立するために、Ba/F3細胞を、FGFR2bまたはFGFR2cを発現するよう操作した。Ba/F3細胞を、ヒトFGFR2の2bまたは2cアイソフォームをコードするプラスミドでトランスフェクトした。G418による選択後に、FGFR2bまたはFGFR2cの高い発現を有する単一クローンを単離した。

【0169】

40

[000196] ヒトFGFR2bのベータ-アイソフォーム(IgD2およびIgD3ドメイン)を、DNAプラスミドにおいてFGFR2bの細胞外ドメイン(「ECDドメイン」)残基65~267(Genbankアクセッション番号NP_001138391)をヒトFc領域(残基100~330)に融合することによって免疫接着分子として発現させた。タンパク質は、ヒト293F細胞(Invitrogen社)をトランスフェクトすることによって発現させて、プロテインA/Gカラムを使用して培養培地から精製した。

【0170】

[000197] カニクイザル(cyno)FGFR2b ECDドメインのcDNAを標準的な技法によってcyno皮膚mRNAからクローニングして、アミノ酸1~253をマウ

50

スFcに融合して、発現用のcyno FGFR2b-Fcを創出した。マウスFcと融合させたヒト(hu)FGFR2b(NP_001138391の65~267)またはラットFGFR2b(NP_001103363.1の56~308)のECDドメイン残基もまた発現させた。ラットおよびマウスFGFR2b ECDは同一である。

【0171】

[000198]組換えFGFR1b-Fc、FGFR1c-Fc、FGFR2c、FGFR1c-Fc、FGFR3b-Fc、FGFR3c-FcおよびFGFR4-Fcタンパク質を含む他のヒトFGFRファミリーメンバーのヒトFc融合タンパク質は全て、R&D Systems社から購入した。FGFR2b-Fcのアルファ-アイソフォーム、FGFもまたR&D Systems社から購入した。ヘパリンは、Sigma-Aldrich社から入手した(Sigma社、#H3149-500KU-9)。PBMCは、AllCell社から購入した(#LP180322)。

10

【0172】

[000199]臨床病期抗ヒトFGFR2b特異的抗体FPA144は、関連特許出願である国際公開第2015/017600 A1号に従って発現させた。

実施例2

抗FGFRモノクローナルAbの生成

[000200]Balb/cマウスまたはSJLマウスを、CFA/IFAにおいてヒトFGFR2b(ベータ)-Fcで、初期用量50µg/マウス、続く25µg/マウスで、または初期用量10µg/マウス、続く5µg/マウスにて腹腔内で免疫化した。ヒトFGFR2b-FcまたはヒトFGFR2c-Fcに対する血清力価をELISAによって決定した。最終的な注射の4日後に、膝窩リンパ系細胞を抽出して、マウス骨髄腫細胞と融合させた。融合の10日後、ハイブリドーマ培養物上清を、ELISAによって、まずFGFR2b(ベータ)-Fc対NC-Fc(陰性対照としてのFc断片)結合に関してスクリーニングした。FGFR2b(ベータ)-Fcに結合するが、NC-Fcに結合しない抗体を有するハイブリドーマを選択した。一次スクリーニングを通過したハイブリドーマを、FACSによるBaF3/FGFR-2b細胞およびBaF3/FGFR-2cへの結合、FGFRリガンド結合の遮断、および細胞死滅を含む二次スクリーニングパネルに付した。Ab 36と称されるクローンを含む幾つかの陽性クローンをこのようにして選択した。これらの選択されたクローンによって産生されるモノクローナル抗体のアイソタイプを、アイソタイプ特異的な抗体を使用して決定した。

20

30

【0173】

実施例3

Ab 36のヒト化

[000201]Ab 36の重鎖および軽鎖可変(VH、VL)領域配列を、標準的なRACE技術を使用して決定した。総RNAを、選択されたハイブリドーマ細胞系から抽出した。続いて、5'末端を含有する完全長の第1鎖cDNAを、製造業者の指示書に従ってSMART RACE cDNA増幅キット(Clontech社、パロアルト、CA)またはGene Racerキット(Invitrogen社)を使用して生成して、PCRによって増幅させた。PCR産物を単離して、精製した後、TAクローニングして、配列決定した。

40

【0174】

[000202]次に、キメラ抗体Ab 36cを、マウスAb 36のVHおよびVLをヒトFcにグラフトすることによって生成した。そして、分子生物学の標準的な方法を使用して、Ab 36のヒト化を設計、構築および発現した。簡潔に述べると、マウスAb 36のCDRをヒトアクセプターフレームワークにグラフトした。続いて、コンピューターモデルがCDRとの著しい接触を示唆するフレームワーク位置で、マウス抗体由来のアミノ酸残基を、ヒトフレームワークアミノ酸残基に代わって置換した(Kabatナンバリングを使用した重鎖のM48IおよびV68Aならびに軽鎖の49Fを含む)。これにより、Ab hu36-2と呼ばれるAb 36のヒト化抗体が提供された。Ab hu36-

50

2の重鎖のCDR2におけるアミノ酸NGを、さらに置換した。Ab 36、Ab 36c、およびAb hu36-2のCDR領域配列および可変領域配列の重鎖および/または軽鎖を、上述の表1～表3に示す。

【0175】

[000203]ヒトIgG1を有する全成熟Ab hu36-2軽鎖および重鎖のアミノ酸配列を図1に示す。

実施例4

抗体の脱フコシル化

[000204]抗体36、36cまたはhu36-2の脱フコシル化されたモノクローナル抗体(「afhu36」と呼ばれる、ここで接頭辞「af」は「脱フコシル化された」の省略である)を生成するために、1,6-フコシルトランスフェラーゼノックアウト(FUT8-/-)CHOK1細胞(Wuxi Biologics社、中国、上海)を宿主細胞系として使用して、フコースを含まない抗体(即ち、脱フコシル化された抗体)を産生する。ヒトIgG1定常Fcを有するモノクローナル抗体36、36c、またはhu36-2の重鎖(HC)および軽鎖(LC)をコードするヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを、Wuxi biologicsのプロトコールに従ってFUT8-/-CHOK1に一過的にトランスフェクトして、抗体を産生する。

【0176】

[000205]脱フコシル化された抗体をプロテインAおよびSEC-HPLCによって精製し、透析して、製剤緩衝液に交換し、-80で保管する。精製した脱フコシル化された抗体のグリカン、LC-MSを使用して分析する。各ピークの質量を決定して、各グリカンを同定するのに使用し、結果により、脱フコシル化された抗体はそれぞれ、ほぼ100%脱フコシル化されていることが実証されている。脱フコシル化された抗体は、それらのフコシル化対応物と比較した場合に、少なくとも同等なin vitroまたはin vivo活性を提供すると予想される。

【0177】

実施例5

抗体の結合特性

[000206]抗体の、ヒトFGFR2b抗原への結合を、表面プラズモン共鳴(Biacore社)によって決定した。簡潔に述べると、CM5センサーチップ(GE Healthcare Life Sciences社)をまず、50mM N-ヒドロキシスクシンアミド(NHS):200mM ECDドメインの1:1の新鮮な混合物の4分の注射によって活性化させた。次に、hFGFR2b-Fcを、アミンカップリングキット(GE Healthcare Life Sciences社)およびブロック試薬として1Mエタノールアミンを使用して、活性化したCM5センサーチップに固定化した。約20~30レスポンス単位(RU、1RUは、1平方ミリメートル当たりタンパク質1pgの結合を表す)の抗原タンパク質を捕捉した。

【0178】

[000207]抗体をHBS-EP+ランニング緩衝液(GE Healthcare Life Sciences社)(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20、pH7.4)中に希釈して、一連の濃度(0、6.25、12.5、25、50、100、150、200nM)で注射して、CM5センサーチップの表面再生が、各ランニングサイクルに含まれた。結合定数、解離定数を、Biacore T200評価ソフトウェア(バージョン1.0)を用いて算出した。図2に示されるように、Ab 36c(キメラ)およびそのヒト化変異体Ab hu36-2は、187または189pMの範囲のKD値でヒトFGFR2bに対して強力な結合親和性を示し、これは、競合体抗体FPA144よりも良好である。

【0179】

[000208]選択した抗体が、細胞膜上のFGFR2bの内因性形態に結合することができることを確認するために、FGFR2bを発現するKATOIII細胞を使用して、フ

10

20

30

40

50

ローサイトメトリーを実施した。抗体は全て、10%ロバ血清(Jackson ImmunoGen社 #017-000-121)を有するPBS緩衝液中で調製した。500,000個のKATOIII細胞を種々の濃度の抗FGFR2b抗体100 μ lとともに、4で60分間インキュベートした。細胞を2回洗浄して、10 μ g/mlの二次IgG-Alexa488抗体(Jackson ImmunoGen社 #709546149)100 μ l中で、4で暗所にて30分間インキュベートした。細胞を3回洗浄して、洗浄緩衝液を用いて再懸濁させて、フローサイトメーターで分析した。FACSデータにより、Ab 36cは、図3に示されるように、EC₅₀値およそ8nMでKATOIII細胞に強力に結合することが明らかに示された。Ab 36cと同様に、Ab hu36-2は、KATOIII細胞への特異的結合も示した(データは示していない)。

10

【0180】

[000209]Ab 36cの、組換えcyno、ラット/マウス、およびヒトFGFR2b-Fc融合タンパク質への種間結合を、ELISAを用いて行った。簡潔に述べると、96ウェルELISAプレートを、PBS中で0.1 μ g/mlの組換えヒトFGFR2b-Fc、組換えラット/マウスFGFR2b-Fc、または組換えcynoFGFR2b-Fcタンパク質約100 μ l/ウェルを用いて一晚コーティングした。次に、プレートを、0.05%Tween20を有するPBS中の2%BSA中でブロックして、抗体試料とともに室温で60分間インキュベーションして、続いて1 \times TBST(Cell Signaling Technology社、#9997)中で2回洗浄した後、抗ヒトIgG HRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)コンジュゲートとともに室温で60分間インキュベーションした。HRP活性を、テトラメチルベンジジン基質(Cell Signaling Technology社、#7004)を用いて検出して、反応は、停止溶液(Cell Signaling Technology社、#7002)を用いて停止させた。プレートを450nmで読み取った。図4に示されるように、異なる種のFGFR2bへのAb 36cに関する結合EC₅₀において著しい差は見られない。Ab 36cは、ラット/マウスFGFR2bに対して最も高い結合親和性を有し、続いてヒトFGFR2b、次にcynoFGFR2bと続く。Ab 36cと同様に、Ab hu36-2は、種々の種のFGFR2bへの特異的結合も示した(データは示していない)。

20

【0181】

[000210]同様に、Ab 36の、様々なFGFRファミリーメンバーであるFGFR1b、FGFR3c、FGFR3b、FGFR4との結合特異性を、ELISAアッセイを用いて特性化した。データを図5に示す。ELISA分析の結果に従って、Ab 36は、FGFR2bに特異的に結合し、Ab 36は、任意の他のFGFRファミリーメンバーには結合しない。Ab 36cと同様に、Ab hu36-2は、ELISA分析において、FGFR2bへの特異的結合も示したが、任意の他のFGFRファミリーメンバーへの特異的結合は示さなかった(データは示していない)。

30

【0182】

実施例6

in vitro阻害活性

[000211]リガンド誘導性細胞増殖に対する抗体の阻害活性を、FGFR2b操作Ba/F3細胞クローン(Ba/F3-FGFR2b)において実行した。細胞を、ヘパリン(10 μ g/ml)の存在下で10%ウシ胎児血清および組換えヒトFGFタンパク質(10ng/ml)を含有するRPMI1640培地中で30,000個の細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種した。一晚のインキュベーション後、種々の濃度の抗FGFR2b抗体をアッセイプレートに添加して、さらに72時間インキュベートした。72時間のインキュベーション後、CellTiter Aqueous One Solution試薬20 μ lを各ウェルに添加して、プレートを室温で2時間インキュベートした。吸光度を測定するために、10%SDS 25 μ lを各ウェルに添加して、反応を停止させた。Tecan Spark 20Mで、490nmおよび650nm(参照波長)にて吸

40

50

光度を測定した。Ab 36cは、GI50約10nMで、FGF7誘導性BaF3細胞増殖を強力に阻害することができる。Ab 36cのこの阻害活性データを、Prismを使用して処理して、図6にグラフを示した。Ab 36cと同様に、Ab hu36-2は、FGF7誘導性BaF3細胞増殖の強力な阻害も示した(データは示していない)。

【0183】

[000212]抗体によるFGFR2bシグナル伝達経路の阻害を検討した。SNU16細胞を、10%FBSを有するRPMI培地中で成長させ、続いて30,000個/ウェルで播種して、無血清RPMI/0.1%BSA中で一晚飢餓させた。次に、細胞を、こすり取ることによって収集して、冷PBS中で1回洗浄した後、2xSDS溶解緩衝液(100mM Tris pH6.8、4%SDS、20%グリセロールおよび1xプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤(Pierce社)中に溶解した。続いて、溶解物を100で10分間沸騰させた。BCAタンパク質アッセイキット(Pierce社)によって、タンパク質濃度を検出し、等量のタンパク質をSDS-PAGEゲルに負荷して、続いてタンパク質を、iBolt(Invitrogen社)を使用してニトロセルロース膜に転写した後、それを、FGFR2およびその下流の遺伝子ERKのリン酸化に関するウェスタンブロットング分析に付した。図7に示されるように、Ab 36c処置は、SNU16細胞において用量依存的様式で、リン酸化FGFR2およびリン酸化ERKのダウンレギュレーションをもたらす。Ab 36cと同様に、Ab hu36-2は、リン酸化FGFR2およびリン酸化ERKのダウンレギュレーションも示した(データは示していない)。

【0184】

[000213]抗体のADCC活性を決定するための*in vitro*アッセイを実施した。ADCCアッセイは、エフェクター細胞としてEasySep(商標)ヒトNK細胞単離キット(Stemcell社、#17955)によってヒトPBMC(AllCells社、CAT#PB0004F)から単離した原発性NK細胞を、エフェクター対標的(E/T)細胞比8:1で使用して実施した。ヒトPBMCを、10%FBS+HEPES 10mM+ピルビン酸ナトリウム 1mMを含有するRPMI1640中で解凍して、その翌日にFACSアッセイを実行した。標的細胞KATOIIIを細胞マーカーCFSE-FITC(Invitrogen、#C34554)で30分間染色した後、エフェクターおよび抗体の存在下で37にて5時間インキュベートした。次に、細胞を、生存度マーカーViability染色-APC-Cy7(BD社、#565388)を用いて染色した。細胞傷害性溶解は、CFSE染色および生存度マーカー染色の両方に関して陽性である細胞をゲーティングすることによってFACSにより決定した。データを図8に示した。Hu36-2および36cは、最大溶解パーセント80%およびEC₅₀ 0.023μg/mlで良好なADCC活性を有する。Afhu36は、Ab 36と比較した場合に著しく良好なADCC活性を示し、脱フコシル化が、最大溶解パーセントおよびEC₅₀の両方におけるAb 36のADCC活性を改善させたことを示す。同様の結果が、同様にaf36cおよびafhu36-2でも得られる。

【0185】

実施例7

腫瘍マウスモデルにおける抗体の*in vivo*抗腫瘍活性

[000214]免疫不全ヌードマウスをVitaRiver社から購入した。動物研究は全て、IACUCによって認可され、内規および地方規制の要件に従って実施した。

【0186】

[000215]細胞系由来異種移植片(CDX)マウスモデルを、まず細胞(例えば、KYSE180およびSNU16細胞)を*in vitro*で培養すること、次にSNU16の50%Matrigel/マウスと混合した1x10⁷個の細胞/200μlまたは5x10⁶個の細胞/100μl/マウスでマウスの背面側腹部に細胞を皮下接種することによって樹立し、異種移植片腫瘍が300~500mm³のサイズに達したら、それらを切除して、同じサイズの断片に切断して、ヌードマウスの新たな群に皮下(s.c.)移

植した。LC038ヒト肺癌患者由来異種移植片(PDX)マウスモデルを同様の様式で樹立した。簡潔に述べると、患者由来の外科的に取り出した組織(F0)を、同じサイズの断片に切断して、手術後2時間以内に免疫無防備状態のヌードマウスに皮下移植した(F1マウス)。異種移植片腫瘍が400~600mm³のサイズに達したら、それらを切除して、断片に切断して、継代培養のためにヌードマウスに移植し、それはF2であり、以下同様であった。

【0187】

[000216]腫瘍小結節を、キャリパーを用いて二次元で測定し、下記の式を使用して、腫瘍体積を算出した：腫瘍体積 = (長さ × 幅²) × 0.52。腫瘍体積が150~250mm³に達したら、腫瘍保有マウスを処置群に無作為抽出した。続いて、マウスをアイソタイプ対照(即ち、IgG1)または検査抗体(即ち、FPA144、Ab36c)のいずれかで、無作為抽出の翌日から週に1回/2回処置した。マウスの腫瘍体積および体重を週に2回測定し、生データを記録した。対照群と処置群との間の腫瘍体積の平均変化を比較することによって、処置の開始からの腫瘍成長阻害を評価した。計算は、各群における相対腫瘍体積(RTV)の幾何平均または算術平均に基づいた。RTVは、処置日の腫瘍体積を初期腫瘍体積で除算することによって算出した。

10

【0188】

[000217]Ab36cまたはFPA144処置を用いたSNU16細胞、LC038PDX細胞、およびKYS180の*in vivo*腫瘍成長曲線を、それぞれ図9A、図9B、および図9Cに示した。3つ全てのモデルにおいて、Ab36cは、抗体FPA144よりも良好な抗腫瘍活性を示す。同様の結果が、同様にhu36-2でも得られる。

20

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

DIQMTQSPSSLSASVGDVRVITTC~~KASQD~~VSTNVAVYQKPKGAPKLLIFSASRYTGV
 VPSRFSGSGSGTDFITFISSLQPEDIAITYYCQQHYSSPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTY
 SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURE 1A

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFISY~~NMH~~WVRQAPGGLEWIGAI~~FP~~ENG
 DTSY~~NQ~~KFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSED~~AV~~YYCARG~~G~~EDYWGQGT~~TV~~TV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURE 1B

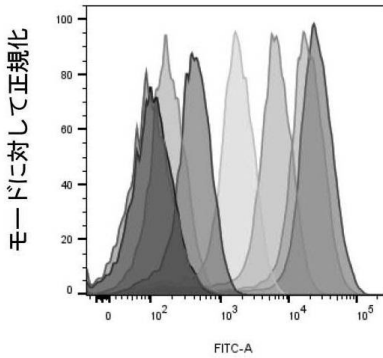
【 図 2 】

hFGFR2b			
Ab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FPA144	1.035E+05	7.766E-05	7.504E-10
36c	1.29E+05	2.44E-05	1.89E-10
Hu36-2	1.28E+05	2.39E-05	1.87E-10

FIGURE 2

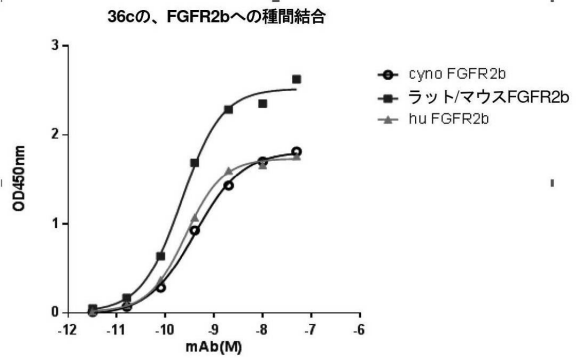
10

【 図 3 】



試料名	サブセット名	計数	平均値FITC-A
KATOIII_36C 00009nM_026.fcs	リン球	9842	121
KATOIII_36C 0004nM_025.fcs	リン球	9837	128
KATOIII_36C 002 nM_024.fcs	リン球	9837	199
KATOIII_36C 01nM_023.fcs	リン球	9829	455
KATOIII_36C 05nM_022.fcs	リン球	9830	1798
KATOIII_36C 3nM_021.fcs	リン球	9817	8587
KATOIII_36C 13nM_020.fcs	リン球	9849	19205
KATOIII_36C 87nM_019.fcs	リン球	9852	26806

【 図 4 】



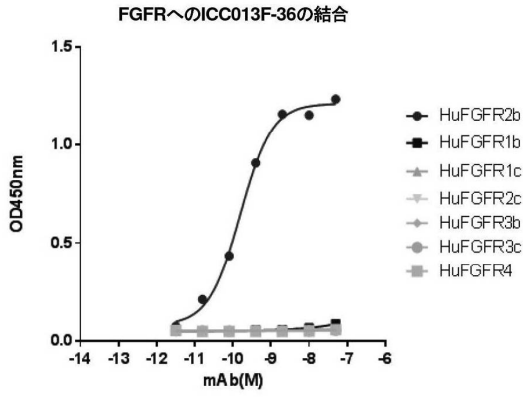
20

30

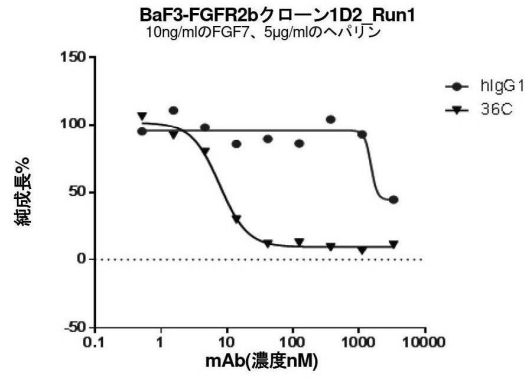
40

50

【 図 5 】

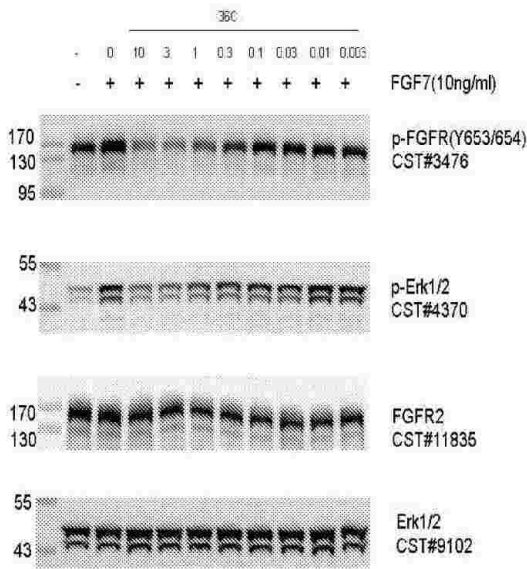


【 図 6 】

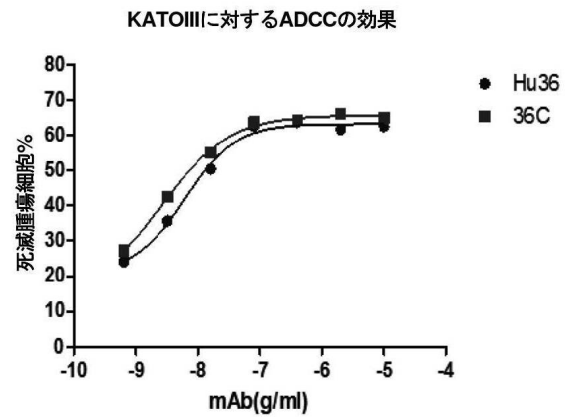


10

【 図 7 】



【 図 8 】



20

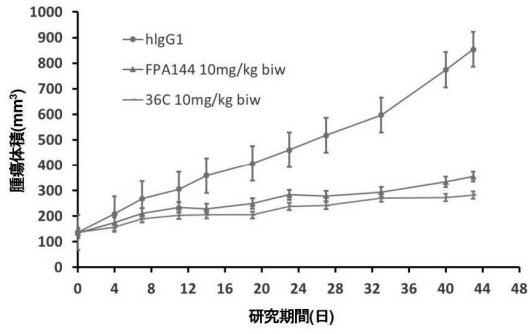
30

FIGURE 7

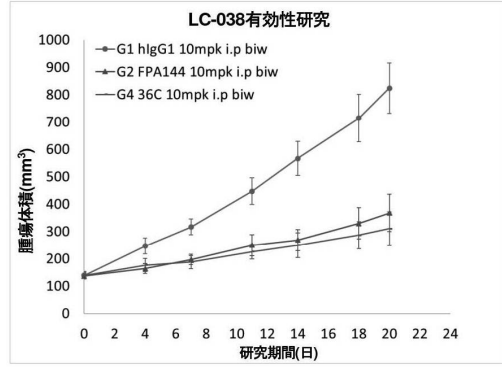
40

50

【 図 9 A 】

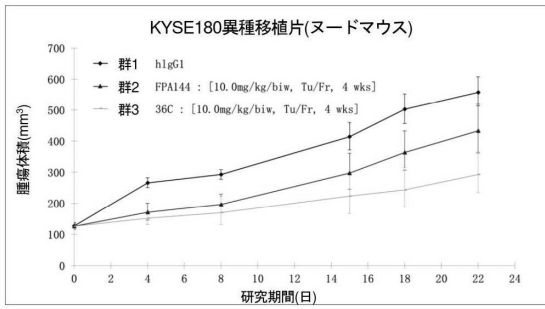


【 図 9 B 】



10

【 図 9 C 】



20

【 配列表 】

0007692419000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 49/00 (2006.01)
 A 6 1 K 51/10 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 G 0 1 N 33/574 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 49/00
 A 6 1 K 51/10 2 0 0
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 39/395 C
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 P
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 E
 G 0 1 N 33/574 A
 C 1 2 N 15/13

中華人民共和国シャanghai 2 0 1 2 0 3 , チャンチアン・ハイテック・パーク , リャンジン・ロ
 ード ナンバー 1 9 9

(72)発明者

グオ, チウリ

中華人民共和国シャanghai 2 0 1 2 0 3 , チャンチアン・ハイテック・パーク , リャンジン・ロ
 ード ナンバー 1 9 9

(72)発明者

バイ, ユー

中華人民共和国シャanghai 2 0 1 2 0 3 , チャンチアン・ハイテック・パーク , リャンジン・ロ
 ード ナンバー 1 9 9

(72)発明者

ヤン, チェンファン

中華人民共和国シャanghai 2 0 1 2 0 3 , チャンチアン・ハイテック・パーク , リャンジン・ロ
 ード ナンバー 1 9 9

(72)発明者

チャン, シャオリン

中華人民共和国シャanghai 2 0 1 2 0 3 , チャンチアン・ハイテック・パーク , リャンジン・ロ
 ード ナンバー 1 9 9

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 2 7 2 7 3 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 3 8 2 7 4 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3
 C 0 7 K 1 6 / 2 8
 C 0 7 K 1 6 / 4 6
 C 1 2 N 1 5 / 6 3
 C 1 2 N 1 / 1 5
 C 1 2 N 1 / 1 9
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 5 / 1 0
 C 1 2 P 2 1 / 0 8
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 A 6 1 K 4 9 / 0 0
 A 6 1 K 5 1 / 1 0
 A 6 1 K 4 7 / 6 8
 A 6 1 K 4 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q