

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-518332

(P2016-518332A)

(43) 公表日 平成28年6月23日 (2016. 6. 23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006. 01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 164 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-502005 (P2016-502005)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月9日 (2015. 11. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/025944
 (87) 国際公開番号 W02014/160160
 (87) 国際公開日 平成26年10月2日 (2014. 10. 2)
 (31) 優先権主張番号 61/780, 299
 (32) 優先日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

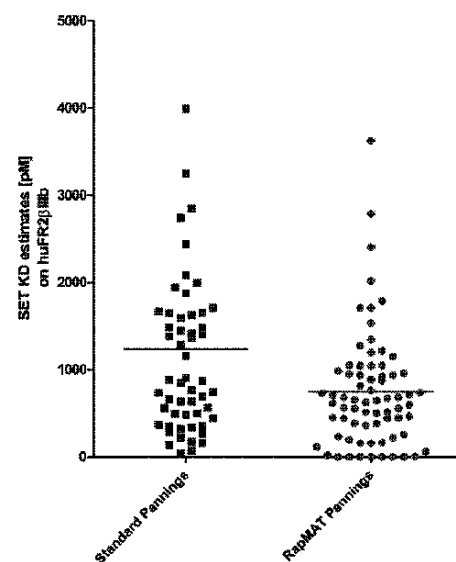
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体薬物コンジュゲート

(57) 【要約】

本発明は、抗 F G F R 2 および F G F R 4 抗体、抗体断片、抗体薬物コンジュゲート、およびがんの処置のためのそれらの使用に関する。

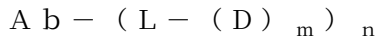
FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：



(式中、

A b はヒト F G F R 2 および F G F R 4 の両方に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり；

L はリンカーであり；

D は薬物部分であり；

m は 1 ～ 8 の整数であり；および

n は 1 ～ 10 の整数である)

10

の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2】

前記 m が 1 である、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3】

前記 n が 3 または 4 である、請求項 1 または 2 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 4】

前記抗体または抗原結合性断片が、ヒト F G F R 2 の全てのアイソフォームに特異的に結合する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 5】

20

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 3 7 のアミノ残基残基 1 7 6 (L y s) および 2 1 0 (A r g) を含むヒト F G F R 2 上のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 6】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 3 7 のアミノ残基 1 7 3 (A s n)、1 7 4 (T h r)、1 7 5 (V a l)、1 7 6 (L y s)、1 7 8 (A r g)、2 0 8 (L y s)、2 0 9 (V a l)、2 1 0 (A r g)、2 1 2 (G l n)、2 1 3 (H i s)、2 1 7 (I l e) および 2 1 9 (G l u) に特異的に結合する、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 7】

30

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 3 6 または配列番号 1 4 1 を含むヒト F G F R 2 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 3 6 または配列番号 1 4 1 からなるヒト F G F R 2 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 4 2 のアミノ酸残基 1 6 9 (L y s) および 2 0 3 (A r g) を含むヒト F G F R 4 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

40

【請求項 10】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 3 7 のアミノ残基残基 1 7 6 (L y s) および 2 1 0 (A r g) を含むヒト F G F R 2 のエピトープ、および配列番号 1 4 2 のアミノ酸残基 1 6 9 (L y s) および 2 0 3 (A r g) を含むヒト F G F R 4 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 11】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 1 4 2 のヒト F G F R 4 のアミノ残基 1 5 0 (T h r)、1 5 1 (H i s)、1 5 4 (A r g)、1 5 7 (L y s)、1 6 0 (H i s)、1 6 6 (A s n)、1 6 7 (T h r)、1 6 8 (V a l)、1 6 9 (L y s)、1

50

71 (Arg)、173 (Pro)、174 (Ala)、201 (Arg)、202 (Leu)、203 (Arg)、204 (His)、205 (Gln)、206 (His)、207 (Trp)、210 (Val) および 212 (Glu) に特異的に結合する、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 132 または 133 を含むヒト FGFR 4 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 132 または 133 からなるヒト FGFR 4 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

10

【請求項 14】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、(a) 配列番号 1、21、41、61、81 または 101 の VH CDR1、(b) 配列番号 2、22、42、62、82 または 102 の VH CDR2、および (c) 配列番号 3、23、43、63、83 または 103 の VH CDR3 を含む重鎖可変領域を含み、前記 CDR が、Kabat 定義に従って規定される、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 15】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、(a) 配列番号 11、31、51、71、91 または 111 の VL CDR1、(b) 配列番号 12、32、52、72、92 または 112 の VL CDR2、および配列番号 13、33、53、73、93 または 113 の VL CDR3 を含む軽鎖可変領域をさらに含み、前記 CDR が、Kabat 定義に従って規定される、請求項 14 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

20

【請求項 16】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 7、27、47、67、87 または 107 の VH 領域、および配列番号 17、37、57、77、97 または 117 の VL 領域を含む、請求項 15 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 17】

前記抗体が、配列番号 9、29、49、69、89 または 109 の重鎖、および配列番号 19、39、59、79、99 または 119 の軽鎖からなる、請求項 16 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

30

【請求項 18】

前記抗体または抗原結合性断片が、ヒト FGFR 2 および FGFR 4 への結合に対して配列番号 9、29、49、69、89 または 109 の重鎖、および配列番号 19 の軽鎖からなる抗体と交差競合する、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 19】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 9、29、49、69、89 または 109 の重鎖、および配列番号 19、39、59、79、99 または 119 の軽鎖からなる抗体と比較した場合に、増強された ADCC 活性を有する、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

40

【請求項 20】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 9、29、49、69、89 または 109 の重鎖、および配列番号 19、39、59、79、99 または 119 の軽鎖からなる抗体と比較した場合に、増強された ADCC 活性を有さない、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 21】

前記抗体が、ヒト抗体である、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 22】

50

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 3】

前記リンカーが、切断性リンカー、非切断性リンカー、親水性リンカー、プロチャージリンカーおよびジカルボン酸に基づくリンカーからなる群から選択される、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 4】

前記リンカーが、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(SPD P)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPD P)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPD B)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート(スルホ-SPD B)、N-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)、マレイミドPEG N H S、N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(スルホ-SMCC)または2,5-ジオキソピロリジン-1-イル17-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5,8,11,14-テトラオキソ-4,7,10,13-テトラアザヘプタデカン-1-オエート(CX1-1)からなる群から選択される架橋試薬から誘導される、請求項 2 3 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

10

20

【請求項 2 5】

前記リンカーが、架橋試薬N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)から誘導される、請求項 2 4 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 6】

前記薬物部分が、V-ATPase阻害剤、プロアポトーシス剤、Bcl2阻害剤、MCL1阻害剤、HSP90阻害剤、IAP阻害剤、mtor阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、オーリスタチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、MetAP(メチオニンアミノペプチダーゼ)、タンパク質CRM1の核輸送の阻害剤、DPPIV阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、CDK2阻害剤、CDK9阻害剤、キネシン阻害剤、HDAC阻害剤、DNA損傷剤、DNAアルキル化剤、DNA挿入剤、DNA副溝結合剤およびDHFR阻害剤からなる群から選択される、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

30

【請求項 2 7】

前記細胞毒性剤がメイタンシノイドである、請求項 2 6 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 8】

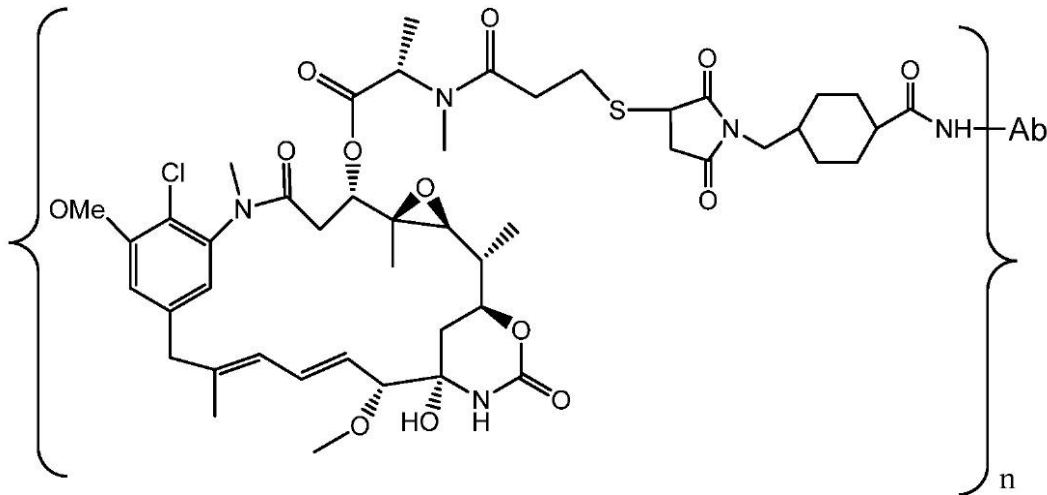
前記メイタンシノイドが、N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)またはN(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)である、請求項 2 7 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

40

【請求項 2 9】

下記式：

【化 1 5】



10

(式中、

Abは、配列番号1、21、41、61、81または101の重鎖CDR1、配列番号2、22、42、62、82または102の重鎖CDR2、配列番号3、23、43、63、83または103の重鎖CDR3、および配列番号11、31、51、71、91または111の軽鎖CDR1、配列番号12、32、52、72、92または112の軽鎖CDR2、配列番号13、33、53、73、93または113の軽鎖CDR3を含む抗体またはその抗原結合性断片であり、前記CDRは、Kabat定義に従って規定され；
 および

20

nは1～10である)

を有する、請求項1に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項30】

請求項1から29のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項31】

30

前記組成物が、凍結乾燥物として調製される、請求項30に記載の医薬組成物。

【請求項32】

前記凍結乾燥物が、前記抗体薬物コンジュゲート、コハク酸ナトリウム、およびポリソルベート20を含む、請求項31に記載の医薬組成物。

【請求項33】

それを必要とする患者におけるFGFR2陽性および／またはFGFR4陽性がんを処置する方法であって、請求項1から30のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート、または請求項30から32のいずれかに記載の医薬組成物を、前記患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項34】

40

前記がんが、FGFR2遺伝子コピー数の増加またはPAX3-FOXOトランスロケーションを有する、請求項29に記載の方法。

【請求項35】

前記がんが、胃がん、乳がん、横紋筋肉腫、肝臓がん、副腎がん、肺がん、食道がん、結腸がんおよび子宮内膜がんからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

チロシンキナーゼ阻害剤、IAP阻害剤、Bcl2阻害剤、MCL1阻害剤または別のFGFR2阻害剤を、前記患者に投与する工程をさらに含む、請求項33または34に記載の方法。

【請求項37】

50

前記別の F G F R 2 阻害剤が、3- (2, 6-ジクロロ-3, 5-ジメトキシフェニル)-1- {6- [4- (4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-1-メチル尿素またはその薬学的に許容される塩である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記がんが、チロシンキナーゼ阻害剤に耐性である、請求項 33 または 35 に記載の方法。

【請求項 39】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、E G F R、H e r 2、H e r 3、I G F R または M e t 阻害剤である、請求項 38 に記載の方法。

10

【請求項 40】

患者において H e r 2 阻害剤に耐性であるがんを処置する方法であって、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート、または請求項 30 から 32 のいずれかに記載の医薬組成物を、前記患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 41】

医薬としての使用のための、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 42】

F G F R 2 陽性または F G F R 4 陽性がんの処置における使用のための、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート、または請求項 31 から 33 のいずれかに記載の医薬組成物。

20

【請求項 43】

チロシンキナーゼ阻害剤に耐性であるがんの処置における使用のための、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート、または請求項 31 から 33 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 44】

E G F R、H e r 2、H e r 3、I G F R または M e t 阻害剤に耐性であるがんの処置における使用のための、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート、または請求項 30 から 32 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 45】

30

F G F R 2 および F G F R 4 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 46】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 137 のアミノ酸残基 176 (L y s) および 210 (A r g) を含むヒト F G F R 2 上のエピトープに特異的に結合する、請求項 45 に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項 47】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 137 のアミノ酸残基 173 (A s n)、174 (T h r)、175 (V a l)、176 (L y s)、178 (A r g)、208 (L y s)、209 (V a l)、210 (A r g)、212 (G l n)、213 (H i s)、217 (I l e) および 219 (G l u) に特異的に結合する、請求項 46 に記載の抗体または抗原結合性断片。

40

【請求項 48】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 136 または配列番号 141 を含むヒト F G F R 2 のエピトープに特異的に結合する、請求項 47 に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項 49】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号 142 のアミノ酸残基 169 (L y s) および 203 (A r g) を含むヒト F G F R 4 のエピトープに特異的に結合する、請求項 46 から 48 に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項 50】

50

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号137のアミノ酸残基176 (L y s) および210 (A r g) を含むヒトF G F R 2のエピトープ、および配列番号142のアミノ酸残基169 (L y s) および203 (A r g) を含むヒトF G F R 4のエピトープに特異的に結合する、請求項45に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項51】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号142のアミノ酸残基150 (T h r) 、151 (H i s) 、154 (A r g) 、157 (L y s) 、160 (H i s) 、166 (A s n) 、167 (T h r) 、168 (V a l) 、169 (L y s) 、171 (A r g) 、173 (P r o) 、174 (A l a) 、201 (A r g) 、202 (L e u) 、203 (A r g) 、204 (H i s) 、205 (G l n) 、206 (H i s) 、207 (T r p) 、210 (V a l) および212 (G l u) に特異的に結合する、請求項45から50のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

10

【請求項52】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号132または133を含むヒトF G F R 4のエピトープに特異的に結合する、請求項45から51のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項53】

前記抗体または抗原結合性断片が、配列番号132または133からなるヒトF G F R 4のエピトープに特異的に結合する、請求項45から51のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

20

【請求項54】

(a) 配列番号1、21、41、61、81または101のV H C D R 1、(b) 配列番号2、22、42、62、82または102のV H C D R 2、および(c) 配列番号3、23、43、63、83または103のV H C D R 3を含む重鎖可変領域を含み、前記C D Rが、K a b a t 定義に従って規定される、請求項45から53のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項55】

(a) 配列番号11、31、51、71、91または111のV L C D R 1、(b) 配列番号12、32、52、72、92または112のV L C D R 2、および配列番号13、33、53、73、93または113のV L C D R 3を含む軽鎖可変領域をさらに含み、前記C D Rが、K a b a t 定義に従って規定される、請求項54に記載の抗体または抗原結合性断片。

30

【請求項56】

配列番号7、27、47、67、87または107のV H 領域、および配列番号17、37、57、77、97または117のV L 領域を含む、請求項55に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項57】

配列番号9、29、49、69、89または109の重鎖、および配列番号19、39、59、79、99または119の軽鎖からなる、請求項56に記載の抗体。

【請求項58】

前記抗体または抗原結合性断片が、ヒトF G F R 2およびF G F R 4への結合に関して、請求項57に記載の抗体または抗原結合性断片と交差競合する、請求項45に記載の抗体または抗原結合性断片。

40

【請求項59】

前記抗体または抗原結合性断片が、請求項59に記載の抗体と比較した場合に、増強されたA D C C 活性を有する、請求項45に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項60】

前記抗体が、ヒト抗体である、請求項45から59のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項61】

50

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 45 から 60 のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項 62】

前記抗体または抗原結合性断片が、単鎖抗体（s c F v）である、請求項 45 から 61 のいずれかに記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項 63】

前記請求項のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片をコードする核酸。

【請求項 64】

請求項 63 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 65】

請求項 64 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 66】

抗体または抗原結合性断片を生成するための方法であって、

請求項 65 に記載の宿主細胞を培養する工程、および培養物から抗体を回収する工程を含む、方法。

【請求項 67】

抗 F G F R 2 および F G F R 4 抗体薬物コンジュゲートを生成するための方法であって、

（a）S M C C を薬物部分 D M - 1 に化学的に連結する工程；

（b）前記リンカー薬物を、請求項 66 に記載の細胞培養物から回収された抗体にコンジュゲートする工程；および

（c）抗体薬物コンジュゲートを精製する工程を含む、方法。

【請求項 68】

U V 分光光度計を使用して測定される、約 3.5 の平均 D A R を有する、請求項 67 に従って作製される抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 69】

請求項 45 から 62 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片、または標識された請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含む診断試薬。

【請求項 70】

標識が、放射性標識、フルオロフォア、発色団、画像化剤、および金属イオンからなる群から選択される、請求項 69 に記載の診断試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般に、抗 F G F R 2 および F G F R 4 抗体、抗体断片、抗体薬物コンジュゲート、ならびにがんの処置のためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

線維芽細胞増殖因子受容体

F G F 受容体（F G F R）を通じてシグナル伝達する線維芽細胞増殖因子（F G F）は、基礎的な発達経路を調節して、多種多様な組織で発現される。F G F は、増殖、細胞遊走、分化を刺激して、骨格発達および四肢発達、創傷治癒、組織修復、造血、血管形成および腫瘍発生において重要な役割を果たす（例えば、Turner and Crose, Nature Reviews Cancer 10: 116-129 (2010)を参照）。

【0003】

哺乳動物 F G F ファミリーは、多くのリガンドを含み、これらは、4つの高度に保存さ

10

20

30

40

50

れた膜貫通チロシンキナーゼ受容体である F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3 および F G F R 4 を通じてそれらの作用を発揮する。典型的な F G F R は、切断されるシグナルペプチド、3つの免疫グロブリン (I g) 様ドメイン (I g ドメイン I、I I および I I I)、酸性ボックス、膜貫通ドメイン、およびスプリットチロシンキナーゼドメインを有する (例えば、Ullrich and Schlessinger, Cell 61: 203 (1990)、Johnson and Williams, Adv. Cancer Res. 60: 1-41 (1992) を参照)。

【0004】

さらに、転写された受容体遺伝子の選択的スプライシングは、可溶性の分泌 F G F R、切断型 C O O H 末端ドメインを有する F G F R、2つまたは3つのいずれかの I g 様ドメインを有する F G F R を含む様々な受容体アイソフォームをもたらし、ならびに第3の I g 様ドメインの選択的スプライシングを介して生じる F G F R アイソフォームは、F G F R 1、F G F R 2 および F G F R 3 に関してのみ行われ、第3の I g 様ドメインの後半を特定し、受容体の I I I b または I I I c アイソフォームをもたらす。受容体の第2および第3の I g 様ドメインは、リガンド結合に関して必要かつ十分であるのに対して、第1の I g 様ドメインは、受容体自己抑制において役割を果たすと考えられている。したがって、異なる受容体およびそれらのアイソフォームは、異なるリガンド結合特異性を示す (例えば、Haugsten et al., Mol. Cancer Res. 8:1439-1452 (2010) を参照)。

【0005】

F G F はまた、別個の F G F R およびそれらのスプライス変異体への結合に加えて、ヘパリン硫酸プロテオグリカン (H S P G) に結合する。それにより、二量体 F G F - F G F R - H S P G 三元複合体が、細胞表面上に形成される。三元複合体は、複合体中の異なる構成成分間の多重相互作用により安定化される。2つの F G F 結合部位であるヘパリン結合部位および受容体間相互作用部位は、受容体の I g 様ドメイン I I および I I I 内で同定されている (Haugsten et al., 2010)。

【0006】

F G F の、F G F R への結合は、受容体二量体形成を誘導し、これにより、キナーゼドメインの活性化ループ中のチロシンのリン酸転移が可能となる。活性な F G F R は、F R S 2 および P L C γ のような多重細胞内タンパク質をリン酸化することが知られている (Eswarakumar et al., Cytokine Growth Factor Rev 16:139-149 (2005))。F G F R シグナル伝達は、細胞増殖および生存の刺激から成長停止、遊走および分化に及ぶ異なる細胞型における別個の生物学的応答を生じる。

【0007】

F G F R およびがん

F G F シグナル伝達は、効果：成長／生存における自己充足性 (self-sufficiency)、血管新生および腫瘍細胞遊走の強力な組合せを媒介する。その結果として、F G F シグナル伝達は、その生理学的機能で発揮される厳格な調節がいったん失われると、強力に発がん性となる可能性がある (例えば、Heinzle et al., Expert Opin. Ther. Targets 15 (7):829-846 (2011) を参照)。

【0008】

F G F R 1、F G F R 2 および F G F R 4 の遺伝子増幅および／または過剰発現は、乳がんに関与している (Penault-Llorca et al., Int J Cancer 1995、Theillet et al., Genes Chrom. Cancer 1993、Adnane et al., Oncogene 1991、Jaakola et al., Int J Cancer 1993、Yamada et al., Neuro Res 2002)。F G F R 1 および F G F R 4 の過剰発現はまた、膵臓腺がんおよび星状細胞腫と関連付けられている (Kobrin et al., Cancer Research 1993、Yamanaka et al., Cancer Research 1993、Shah et al., Oncogene 2002、Yamaguchi et al., PNAS 1994、Yamada et al., Neuro Res 2002)。前立腺がんもまた、F G F R 1 過剰発現に関連する (Giri et al., Clin Cancer Res 1999)。F G F R 4 過剰発現は、横紋筋肉腫に関与している (Khan et al., Nature Medicine 2001、Baird et al., Cancer Res 2005)。胞巣状横紋筋肉腫のサブセットは、F G F R 4 を直接転写的に活性化して、F G F R 4 タンパク質発現の増加をもたらす新規融合タンパク質を生じる P

10

20

30

40

50

A X 3 - F O X O トランスロケーションを保有する (Cao et al., Cancer Res 2010、Davicioni et al., Cancer Res 2006)。

【0009】

概して、F G F R 2 および F G F R 1 は、より一般的に遺伝子増幅により調節解除される。胃がんでは、増幅された F G F R 2 遺伝子は、予後不良と関連付けられる (Kunii et al., Cancer Res. 68:2340-2348 (2008))。また、F G F R 2 - I I I b から I I I c への切り換えは、膀胱がんおよび前立腺がんにおいて腫瘍進行、上皮間葉移行および高い侵襲性の兆候となり得る。切り換えは、この場合、抗腫瘍原性活性を発揮する I I I b 受容体変異体を、腫瘍形成誘発性 (protumorigenic) I I I c 受容体で置換する (例えば、Heinzle et al., 2011を参照)。これまでのところ、F G F R 2 突然変異は、皮膚がん、子宮内膜がん、卵巣がんおよび肺がんに関与している。F G F R 4 突然変異は、横紋筋肉腫がん、肺がんおよび乳がんに関与している (例えば、Heinzle et al., 2011を参照)。

【0010】

抗体薬物コンジュゲート

抗体薬物コンジュゲート (「ADC」) は、がんの処置における細胞毒性剤の局所送達のために使用されてきた (例えば、Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543~549, 2005を参照されたい)。ADCにより、最小の毒性で最大の効能を達成することができる薬物部分の標的化された送達が可能になる。ADCが有望な臨床結果を示すにつれて、がん療法のための新しい治療剤を開発する必要性が増大する。

【発明の概要】

【0011】

発明の要旨

本発明は、式 $A b - (L - (D)_m)_n$ (式中、AbはヒトF G F R 2 およびF G F R 4 の両方に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合性断片であり；Lはリンカーであり；Dは薬物部分であり；mは1~8の整数であり；nは1~10の整数である) またはその薬学的に許容される塩の抗体薬物コンジュゲートを提供する。幾つかの実施形態では、mは1である。幾つかの実施形態では、nは3または4である。特定実施形態では、mは1であり、nは3または4である。

【0012】

本発明は、ヒトF G F R 2 およびヒトF G F R 4 に特異的に結合する抗体または抗原結合性断片を提供する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、ヒトF G F R 4 およびヒトF G F R 2 の全てのアイソフォームに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号137のアミノ酸残基176 (Lys) および210 (Arg) を含むヒトF G F R 2 上のエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号137のアミノ酸残基173 (Asn)、174 (Thr)、175 (Val)、176 (Lys)、178 (Arg)、208 (Lys)、209 (Val)、210 (Arg)、212 (Gln)、213 (His)、217 (Ile) および219 (Glu) に特異的に結合する。本発明はさらに、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0013】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号136または配列番号141を含むか、またはそれからなるヒトF G F R 2 のエピトープに特異的に結合する。本発明はさらに、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0014】

本発明の抗体、抗原結合性断片、および抗体薬物コンジュゲートはまた、ヒトF G F R 4 に特異的に結合する。幾つかの実施形態では、それらは、ヒトF G F R 4 のD1およびD2ドメインに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、それらは、ヒトF G F R 4 の

D1またはD2ドメインに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号142のアミノ酸残基169 (Lys) および203 (Arg) を含むヒトFGFR4上のエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号142のアミノ酸残基150 (Thr)、151 (His)、154 (Arg)、157 (Lys)、160 (His)、166 (Asn)、167 (Thr)、168 (Val)、169 (Lys)、171 (Arg)、173 (Pro)、174 (Ala)、201 (Arg)、202 (Leu)、203 (Arg)、204 (His)、205 (Gln)、206 (His)、207 (Trp)、210 (Val) および212 (Glu) に特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号132または配列番号133を含むか、またはそれからなるヒトFGFR4のエピトープに特異的に結合する。本発明はさらに、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

10

【0015】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号137のアミノ酸残基176 (Lys) および210 (Arg) を含むヒトFGFR2のエピトープ、および配列番号142のアミノ酸残基169 (Lys) および203 (Arg) を含むヒトFGFR4上のエピトープに特異的に結合する。

【0016】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号137のアミノ酸160～189および／または配列番号137のアミノ酸198～216を含むエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号142のアミノ酸150～174および／または配列番号142のアミノ酸201～212を含むエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号137のアミノ酸160～189および／または配列番号137のアミノ酸198～216を含むエピトープ、ならびに配列番号142のアミノ酸150～174および／または配列番号142のアミノ酸201～212を含む第2のエピトープに特異的に結合する。

20

【0017】

幾つかの実施形態では、本発明は、表1に記載する抗体、それらの抗原結合性断片、およびかかる抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、(a) 配列番号1のVH CDR1、(b) 配列番号2のVH CDR2、および(c) 配列番号3のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む抗体および抗原結合性断片を提供し、ここで、CDRは、Kabat定義に従って規定される。幾つかの実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片は、(a) 配列番号1のVH CDR1、(b) 配列番号2のVH CDR2、および(c) 配列番号3のVH CDR3を含む重鎖可変領域、ならびに(a) 配列番号11のVL CDR1、(b) 配列番号12のVL CDR2、および(c) 配列番号13のVL CDR3を含む軽鎖可変領域を含む。本発明はさらに、かかる抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

30

40

【0018】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号7のVH領域および配列番号17のVL領域を含む。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体は、配列番号9の重鎖および配列番号19の軽鎖からなる。本発明はまた、かかる抗体またはその抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0019】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、ヒトFGFR2およびFGFR4への結合に関して、配列番号9の重鎖および配列番号19の軽鎖からなる抗体と交差競合する(cross compete)抗体または抗原断片である。本発明はまた、かかる抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

50

【0020】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号9の重鎖および配列番号19の軽鎖からなる抗体と比較した場合に、増強されたADCC活性を有する。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、配列番号9の重鎖および配列番号19の軽鎖からなる抗体と比較した場合に、増強されたADCC活性を有さない。本発明はまた、かかる抗体または抗原結合性断片を含む抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0021】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体は、モノクローナル抗体である。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体は、モノクローナルヒトまたはヒト化抗体である。

【0022】

幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片、および薬物部分を含む抗体薬物コンジュゲートを提供し、ここで、薬物部分は、リンカーを介して抗体または抗原結合性断片に連結され、上記リンカーは、切断性リンカー、非切断性リンカー、親水性リンカー、プロチャージリンカーおよびジカルボン酸に基づくリンカーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、リンカーは、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(SPP)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)2-スルホブタノエート(スルホ-SPDB)、N-スクシンイミジル-γ-D-アセテート(SIA)、N-スクシンイミジル-(4-γ-D-アセチル)アミノベンゾエート(SIAB)、マレイミドPEG-NHS、N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(スルホ-SMCC)または2,5-ジオキソピロリジン-1-イル-17-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5,8,11,14-テトラオキソ-4,7,10,13-テトラアザヘプタデカン-1-オエート(CX1-1)からなる群から選択される架橋試薬から誘導される。特定の実施形態では、リンカーは、架橋試薬N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)から誘導される。

【0023】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片、および薬物部分を含む抗体薬物コンジュゲートを提供し、ここで前記薬物部分は、V-ATPase阻害剤、プロアポトーシス剤、Bcl2阻害剤、MCL1阻害剤、HSP90阻害剤、IAP阻害剤、mtor阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤(destabilizer)、オーリスタチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、MetAP(メチオニンアミノペプチダーゼ)、タンパク質CRM1の核輸送の阻害剤、DPPiV阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、CDK2阻害剤、CDK9阻害剤、キネシン阻害剤、HDAC阻害剤、DNA損傷剤、DNAアルキル化剤、DNA挿入剤、DNA副溝結合剤(DNA minor groove binder)およびDHFR阻害剤からなる群から選択される。特定実施形態では、本発明の抗体薬物コンジュゲートの薬物部分は、メイタンシノイドである。別の特定実施形態では、本発明の抗体薬物コンジュゲートの薬物部分は、N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)またはN(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)である。

【0024】

1つの実施形態では、本発明は、下記式：

10

20

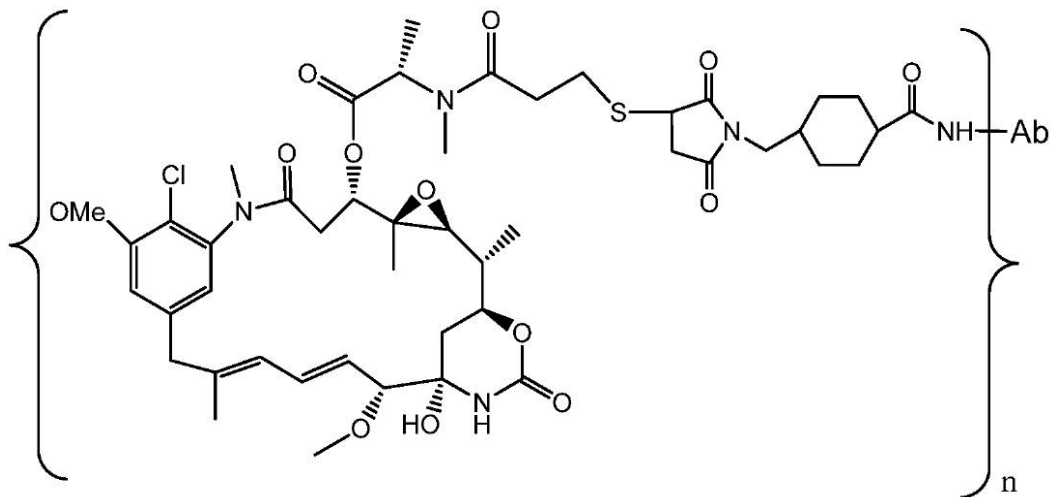
30

40

50

【 0 0 2 5 】

【 化 1 】



10

【 0 0 2 6 】

(式中、A bは配列番号1の重鎖C D R 1、配列番号2の重鎖C D R 2、配列番号3の重鎖C D R 3および配列番号11の軽鎖C D R 1、配列番号12の軽鎖C D R 2、配列番号13の軽鎖C D R 3を含む抗体またはその抗原結合性断片であり、C D Rは、K a b a t

20

を有する抗体薬物コンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩を提供する。特定実施形態では、nは3または4である。1つの実施形態では、A bは、配列番号7のV H領域および配列番号17のV L領域を含む抗体である。別の実施形態では、A bは、配列番号9の重鎖および配列番号19の軽鎖からなる抗体である。

【 0 0 2 7 】

本発明はまた、本明細書中に記載する抗体薬物コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。幾つかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、凍結乾燥物 (lyophilisate) として調製される。幾つかの実施形態では、凍結乾燥物は、本明細書中に記載する抗体薬物コンジュゲート、コハク酸ナトリウム、およびポリソルベート20を含む。

30

【 0 0 2 8 】

本発明は、それを必要とする患者におけるF G F R 2陽性またはF G F R 4陽性がんを処置する方法であって、本明細書中に記載する抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物を、上記患者に投与することを含む、方法を提供する。幾つかの実施形態では、がんは、胃癌、乳がん、横紋筋肉腫、肝臓がん、副腎がん、肺がん、食道がん、結腸がんおよび子宮内膜がんからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、がんは、胞巣状横紋筋肉腫および胎児性横紋筋肉腫から選択される。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する処置方法は、チロシンキナーゼ阻害剤、I A P阻害剤、B c l 2阻害剤、M C L 1阻害剤または別のF G F R 2阻害剤を、上記患者に投与することをさらに含む。特定実施形態では、処置方法は、3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペリジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素またはその薬学的に許容される塩、例えばそのリン酸塩と組み合わせて、本明細書中に記載する抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする患者に投与することを含む。ある特定の態様では、本発明はまた、E G F R阻害剤、H e r 2阻害剤、H e r 3阻害剤、I G F R阻害剤およびM e t阻害剤を含むがこれらに限定されない他のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性ながんを処置する方法を提供する。

40

【 0 0 2 9 】

本発明はさらに、医薬としての使用のための本明細書中に記載する抗体薬物コンジュゲ

50

ートを提供する。本発明は、F G F R 2 陽性がんまたはF G F R 4 陽性がんの処置における使用のための抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物を提供する。本発明は、耐性がん、例えば、E G F R 阻害剤、H e r 2 阻害剤、H e r 3 阻害剤、I G F R 阻害剤およびM e t 阻害剤を含むがこれらに限定されない他のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性であるがんの処置における使用のための抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物を提供する。

【0030】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片は、単鎖抗体（s c F v）である。

【0031】

本発明はまた、本明細書中に記載する抗体または抗原結合性断片をコードする核酸を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、表1に記載するような抗体または抗原結合性断片をコードする核酸を提供する。本発明はさらに、本明細書中に記載する核酸を含むベクター、およびかかるベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0032】

本発明は、本明細書中に記載する宿主細胞を培養すること、および培養物から抗体を回収することを含む、抗体または抗原結合性断片を生成するための方法を提供する。

【0033】

1つの実施形態では、本発明は、（a）S M C Cを薬物部分D M - 1に化学的に連結すること、（b）上記リンカー薬物を、細胞培養物から回収した抗体にコンジュゲートすること、および（c）抗体薬物コンジュゲートを精製することを含む、抗F G F R 2およびF G F R 4抗体薬物コンジュゲートを生成するための方法を提供する。幾つかの実施形態では、上記方法に従って作製される抗体薬物コンジュゲートは、U V分光光度計を使用して測定される、約3.5の平均D A Rを有する。

【0034】

本発明はまた、標識された本明細書中に記載する抗体もしくは抗原結合性断片、または本明細書中に記載する抗体薬物コンジュゲートを含む診断試薬を提供する。幾つかの実施形態では、標識は、放射性標識、フルオロフォア、発色団、画像化剤、および金属イオンからなる群から選択される。

【0035】

定義

別途記述しない限り、本明細書で使用される以下の用語および語句は、以下の意味を有することが意図される。

【0036】

用語「アルキル」とは、特定数の炭素原子を有する一価飽和炭化水素鎖を指す。例えば、C₁ ~ C₆ アルキルとは、1 ~ 6個の炭素原子を有するアルキル基を指す。アルキル基は、直鎖状または分枝状であってもよい。代表的な分枝状アルキル基は、1、2、または3個の分枝を有する。アルキル基の例としては、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル（n-プロピルおよびイソプロピル）、ブチル（n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、およびtert-ブチル）、ペンチル（n-ペンチル、イソペンチル、およびネオペンチル）、ならびにヘキシルが挙げられる。

【0037】

本明細書で使用される用語「抗体」とは、非共有的に、可逆的に、および特異的様式で対応する抗原に結合することができる免疫グロブリンファミリーのポリペプチドを指す。例えば、天然のI g G抗体は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重鎖（H）と2つの軽鎖（L）とを含む四量体である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書でV Hと省略される）と、重鎖定常領域とから構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C H 1、C H 2およびC H 3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書でV Lと省略される）と、軽鎖定常領域とから構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C Lから構成される。V HおよびV L領域は、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる、より保存された領域が散在する、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超可変領

10

20

30

40

50

域にさらに細分することができる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4に配置される3つのCDRと、4つのFRから構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）などの、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0038】

用語「抗体」は、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体など）を含む。抗体は、任意のアイソタイプ／クラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）のものであってもよい。

【0039】

「相補性決定ドメイン」または「相補性決定領域（「CDR」）」は、VLおよびVHの超可変領域を互換的に指す。CDRは、そのような標的タンパク質に対する特異性を担持する抗体鎖の標的タンパク質結合部位である。各ヒトVLまたはVH中には3つのCDR（CDR1～3、N末端から連続的に番号付けられる）が存在し、可変ドメインの約15～20%を占める。CDRは標的タンパク質のエピトープと構造的に相補的であり、かくして、結合特異性を直接担う。VLまたはVHの残りのストレッチ、いわゆるフレームワーク領域は、アミノ酸配列の変化をあまり示さない（Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000）。

【0040】

CDRとフレームワーク領域の位置を、当業界における様々な周知の定義、例えば、Kabat、Chothia、国際Immunogeneticsデータベース（IMGT）（ワールドワイドウェブ上でimgt.cines.fr/にて）およびAbM（例えば、Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)を参照されたい）を使用して決定することができる。抗原結合部位の定義は、以下にも記載されている：Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); およびLefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); およびMartin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); およびRees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

【0041】

軽鎖と重鎖は両方とも、構造的および機能的相同性の領域に分割される。用語「定常」および「可変」は機能的に使用される。これに関して、軽鎖（VL）と重鎖（VH）部分の両方の可変ドメインポーションが抗原認識および特異性を決定付けることが理解される。逆に、軽鎖（CL）および重鎖（CH1、CH2またはCH3）の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠くなるにつれて増大する。N末端は可変領域であり、C末端は定常領域である；CH3およびCLドメインは、それぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端ドメインを実際に含む。

【0042】

本明細書で使用される用語「抗原結合性断片」とは、抗原のエピトープと特異的に相互作用する（例えば、結合、立体障害、安定化／脱安定化、空間分布により）能力を保持する抗体の1または複数のポーションを指す。結合断片の例としては、限定されるものではないが、一本鎖Fv（scFv）、ラクダ科抗体、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、

F a b断片、F (a b ')断片、V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなる一価断片；F (a b) 2断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのF a b断片を含む二価断片；V HおよびC H 1ドメインからなるF d断片；抗体の単一アームのV LおよびV HドメインからなるF v断片；V Hドメインからなるd A b断片 (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) ；ならびに単離された相補性決定領域 (C D R)、または抗体の他のエピトープ結合断片が挙げられる。

【0043】

さらに、F v断片の2つのドメイン、V LおよびV Hは別々の遺伝子によりコードされるが、それらを、組換え方法を使用して、V LおよびV H領域が対形成して一価分子 (一本鎖F v (「s c F v」)) を形成する単一タンパク質鎖として作製することができる合成リンカーにより連結することができる；例えば、Bird et al., Science 242:423-426, 1988;およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988を参照されたい。そのような一本鎖抗体も、用語「抗原結合性断片」内に包含されることが意図される。これらの抗原結合性断片は、当業者には公知の従来の技術を使用して得られ、その断片はインタクト抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングされる。

【0044】

抗原結合性断片を、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-N A Rおよびビスー s c F v (例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005を参照されたい) 中に組込むこともできる。抗原結合性断片を、I I I型フィブロネクチン (F n 3) などのポリペプチドに基づく足場中に移植することができる (フィブロネクチンポリペプチドモノボディを記載する米国特許第6, 703, 199号を参照されたい)。

【0045】

抗原結合性断片を、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成する並列F vセグメント対 (V H-C H 1-V H-C H 1) を含む一本鎖分子に組込むことができる (Zapata et al., Protein Eng. 8:1057-1062, 1995; および米国特許第5, 641, 870号)。

【0046】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または同じ遺伝的起源から誘導される抗体および抗原結合性断片などのポリペプチドを指す。この用語はまた、単一分子組成の抗体分子の調製物も含む。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【0047】

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、フレームワーク領域とC D R領域の両方がヒト起源の配列から誘導される可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域はまた、そのようなヒト配列、例えば、ヒト生殖系列配列、またはヒト生殖系列配列の変異型または例えば、Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000に記載のような、ヒトフレームワーク配列分析から誘導されるコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体から誘導される。

【0048】

本発明のヒト抗体は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基を含んでもよい (例えば、in v i t r oでの無作為もしくは部位特異的突然変異誘発により、またはin v i v oでの体細胞変異により、または安定性もしくは製造を促進するための保存的置換により導入される突然変異)。

【0049】

本明細書で使用される用語「親和性」とは、単一の抗原部位での抗体と抗原との相互作用の強度を指す。それぞれの抗原部位内で、抗体「アーム」の可変領域は、弱い非共有力を介して、いくつかの部位で抗原と相互作用する；相互作用が大きくなるほど、親和性が強くなる。

10

20

30

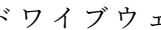
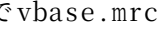
40

50

【0050】

用語「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す。しかしながら、1つの抗原に特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原との交差反応性を有してもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および／または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

【0051】

用語「対応するヒト生殖系列配列」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン可変領域配列によりコードされる他の全ての既知の可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最も高い決定されたアミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列またはサブ配列をコードする核酸配列を指す。対応するヒト生殖系列配列はまた、他の全ての評価された可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最も高いアミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列またはサブ配列を指してもよい。対応するヒト生殖系列配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワーク領域と相補性決定領域、可変セグメント（上記で定義されたもの）、または可変領域を含む配列もしくはサブ配列の他の組合せであってもよい。例えば、BLAST、ALIGN、または当業界で公知の別のアラインメントアルゴリズムを使用して2つの配列を整列させる、本明細書に記載の方法を使用して、配列同一性を決定することができる。対応するヒト生殖系列核酸またはアミノ酸配列は、参照可変領域核酸またはアミノ酸配列との少なくとも約90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有してもよい。相当するヒト生殖系列配列は、例えば、公開されている国際ImMunoGeneTicsデータベース（IMG T）（ワールドワイドウェブ上でにて）およびV-base（ワールドワイドウェブ上でにて）によって決定することができる。

【0052】

抗原（例えば、タンパク質）と抗体、抗体断片、または抗体由来結合剤との間の相互作用を記述する文脈で使用される場合の語句「特異的に結合する」または「選択的に結合する」は、タンパク質および他の生物製剤の異種集団中の、例えば、生物試料、例えば、血液、血清、血漿または組織試料中の、抗原の存在を決定する結合反応を指す。かくして、ある特定の指定されたイムノアッセイ条件下では、特定の結合特異性を有する抗体または結合剤は、バックグラウンドの少なくとも2倍、特定の抗原に結合し、試料中に存在する他の抗原に有意な量で実質的に結合しない。一実施形態では、指定のイムノアッセイ条件下で、特定の結合特異性を有する抗体または結合剤は、バックグラウンドの少なくとも10倍、特定の抗原に結合し、試料中に存在する他の抗原に有意な量で実質的に結合しない。そのような条件下での抗体または結合剤への特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について抗体または薬剤を選択する必要がある。望ましい場合または適切な場合、この選択を、他の種（例えば、マウスもしくはラット）または他のサブタイプに由来する分子と交差反応する抗体を除去することにより達成することができる。あるいは、いくつかの実施形態では、ある特定の所望の分子と交差反応する抗体または抗体断片を選択する。

【0053】

「特異的に結合する」という用語は、エピトープと抗体、抗体断片または抗体由来の結合性作用物質（binding agent）との間の相互作用について記載する状況で使用する場合、エピトープが直鎖状であろうと、立体構造的であろうと、そのエピトープを見つけて、それと相互作用する（例えば、結合する）抗体または抗原結合性断片を指す。用語「エピトープ」とは、本発明の抗体または抗原結合性断片が特異的に結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、タンパク質の三次元折畳みにより並置される連続的アミノ酸または非連続的アミノ酸の両方から形成させることができる。連続的アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露の際に保持されるが、三次元折畳みにより形成されるエピトープは典型的には、変性溶媒による処理の際に失われる。エピトープは、典

型的には、ユニークな空間的コンフォメーション中に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法は、当業界における技術、例えば、x線結晶学および2次元核磁気共鳴を含む（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい）。

【0054】

様々なイムノアッセイ形式を使用して、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択することができる。例えば、タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するためには、固相ELISAイムノアッセイが日常的に使用される（例えば、特異的免疫反応性を決定するのに使用することができるイムノアッセイ形式および条件の説明については、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)を参照されたい）。典型的には、特異的または選択的結合反応は、バックグラウンドシグナルの少なくとも2倍、より典型的には、バックグラウンドの少なくとも10～100倍のシグナルをもたらす。

【0055】

用語「平衡解離定数（KD、M）」とは、解離速度定数（kd、時間⁻¹）を結合速度定数（ka、時間⁻¹、M⁻¹）で除算したものを指す。当業界における任意の公知の方法を使用して、平衡解離定数を測定することができる。本発明の抗体は一般に、約10⁻⁷または10⁻⁸ M未満、例えば、約10⁻⁹ Mまたは10⁻¹⁰ M未満、いくつかの実施形態では、約10⁻¹¹ M、10⁻¹² Mまたは10⁻¹³ M未満の平衡解離定数を有する。

【0056】

用語「バイオアベイラビリティ」とは、患者に投与される所与の量の薬物の全身利用能（すなわち、血液／血漿レベル）を指す。バイオアベイラビリティは、投与される剤形（dosage form）から全身循環に達する薬物の時間（速度）と総量（程度）の両方の尺度を示す絶対項である。

【0057】

本明細書で使用される語句「から本質的になる」とは、方法または組成物中に含まれる活性薬剤の属または種、ならびに方法または組成物の意図される目的にとって不活性な任意の賦形剤を指す。いくつかの実施形態では、語句「から本質的になる」は、本発明の抗体薬物コンジュゲート以外の1または複数のさらなる活性剤の含有を明確に排除する。いくつかの実施形態では、語句「から本質的になる」は、本発明の抗体薬物コンジュゲート以外の1または複数のさらなる活性剤と、第2の同時投与される薬剤との含有を明確に排除する。

【0058】

用語「アミノ酸」とは、天然の、合成の、および非天然のアミノ酸、ならびに天然のアミノ酸と類似する様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるもの、ならびに後に改変されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を有する化合物、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムに結合したα-炭素を指す。そのような類似体は改変されたR基（例えば、ノルロイシン）または改変ペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と類似する様式で機能する化合物を指す。

【0059】

用語「保存的に改変されたバリエーション」は、アミノ酸配列と核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変されたバリエーションとは、同一の、もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない

10

20

30

40

50

場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝子コードの縮重性のため、多数の機能的に同一の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G および G C U は全て、アミノ酸アラニンをコードする。かくして、アラニンがあるコドンによって特定される全ての位置で、そのコドンを、コードされるポリペプチドを変化させることなく記載される対応するコドンのいずれかに変化させてもよい。そのような核酸変化は「サイレント変異」であり、保存的に改変されたバリエーションの 1 種である。ポリペプチドをコードする全ての核酸配列はまた、核酸の全ての可能なサイレント変異を記述する。当業者であれば、核酸中のそれぞれのコドン（通常はメチオニンのための唯一のコドンである A U G と、通常はトリプトファンのための唯一のコドンである T G G を除く）を改変して、機能的に同一の分子を得ることができることを認識できる。従って、ポリペプチドをコードする核酸のそれぞれのサイレント変異は、それぞれ記載される配列中で暗黙的である。

10

【0060】

ポリペプチド配列について、「保存的に改変されたバリエーション」は、あるアミノ酸の、化学的に類似するアミノ酸との置換をもたらすポリペプチド配列に対する個々の置換、欠失または付加を含む。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業界で周知である。そのような保存的に改変されたバリエーションは、本発明の多型バリエーション、種間相同体、および対立遺伝子だけでなく、それを排除しない。以下の 8 群は、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リシン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、トレオニン (T)；および 8) システイン (C)、メチオニン (M)（例えば、Creighton, Proteins (1984) を参照されたい）。いくつかの実施形態では、用語「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意に影響しないか、またはそれを変化させないアミノ酸改変を指すように使用される。

20

【0061】

本明細書で使用される用語「最適化された」とは、生成細胞または生物、一般には、真核細胞、例えば、酵母細胞、ピチア (Pichia) 細胞、真菌細胞、トリコデルマ (Trichoderma) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはヒト細胞において好ましいコドンを使用してアミノ酸配列をコードするように変化したヌクレオチド配列を指す。最適化されたヌクレオチド配列は、「親」配列としても知られる、出発ヌクレオチド配列により元々コードされるアミノ酸配列を完全に、またはできるだけ多く保持するように操作される。

30

【0062】

2 つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における用語「同一であるパーセント」または「同一性パーセント」とは、2 つ以上の配列またはサブ配列が同じである程度を指す。2 つの配列は、それらが比較される領域にわたってアミノ酸またはヌクレオチドの同じ配列を有する場合、「同一」である。2 つの配列が、以下の配列比較アルゴリズムの 1 つを使用して、もしくは手動によるアラインメントおよび視覚的検査により測定される比較ウィンドウ、または指定の領域にわたって最大の一致のために比較および整列された場合、同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドの特定のパーセンテージ（すなわち、特定の領域にわたって、または特定されない場合、配列全体にわたって 60 % の同一性、任意選択で、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 99 % の同一性）を有する場合、2 つの配列は「実質的に同一」である。任意選択で、同一性は、長さ少なくとも約 30 ヌクレオチド（または 10 アミノ酸）である領域にわたって、またはより好ましくは、長さ 100 ~ 500 もしくは 1000 以上のヌクレオチド（または 20、50、200 以上のアミノ酸）である領域にわたって存在する。

40

【0063】

配列比較のために、典型的には、1 つの配列は、試験配列が比較される参照配列として

50

作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列と参照配列とをコンピュータに入力し、サブ配列座標を指定し、必要に応じて、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。デフォルトプログラムパラメーターを使用するか、または代替パラメーターを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列と比較した試験配列に関する配列同一性パーセントを算出する。

【0064】

本明細書で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、2つの配列を最適に整列させた後に、配列を同じ数の連続する位置の参照配列と比較することができる、20～600、通常は約50～約200、より通常は約100～約150からなる群から選択される連続する位置数の任意の1つのセグメントに対する参照を含む。比較のための配列のアラインメントの方法は、当業界で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントを、例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970)の部分相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) により、または手動によるアラインメントおよび視覚的検査 (例えば、Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, 2003を参照されたい) により行うことができる。

【0065】

配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するのに好適であるアルゴリズムの2つの例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; およびAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationにより公共的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合に、いくつかの正の値の閾値スコアTと一致するか、またはそれを満足する、クエリー配列中の短いワード長Wを同定することにより高スコアリング配列対 (HSP) を最初に同定することを含む。Tは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul et al., supra)。これらの初期近隣ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを発見するための検索を開始するための種子として作用する。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増大させることができる限りそれぞれの配列に沿った両方の方向に伸長される。累積スコアを、ヌクレオチド配列については、パラメーターM (一致する残基の対に関するリワードスコア; 常に >0) およびN (不一致の残基のためのペナルティスコア; 常に <0) を使用して算出する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを算出する。それぞれの方向におけるワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量X減少する場合、停止される; 1または複数の負のスコアの残基アラインメントの累積のため、累積スコアはゼロ以下になる; またはいずれかの配列の末端に到達する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列に関する) は、デフォルトとして、11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長、および10の期待値 (E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照されたい)、50のアラインメント (B)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、および両方の鎖の比較を使用する。

【0066】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する (例えば

10

20

30

40

50

、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993を参照されたい)。B L A S Tアルゴリズムにより提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率の指示を提供する、最小合計確率（P（N））である。例えば、試験核酸と参照核酸との比較における最小合計確率が約0.2未満、より好ましくは、約0.01未満、および最も好ましくは、約0.001未満である場合、核酸は参照配列と類似すると考えられる。

【0067】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、P A M 1 2 0 ウェイト残テーブル (weight residue table)、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用して、A L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988のアルゴリズムを使用して決定することもできる。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、B l o s s o m 62マトリックスまたはP A M 2 5 0マトリックス、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重量および1、2、3、4、5または6の長さ重量を使用して、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプログラム（www.gcg.comで利用可能）に組み込まれたNeedleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0068】

上記の配列同一性のパーセンテージ以外に、2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることの別の指示は、以下に記載のように、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドに対して生じた抗体と免疫学的に交差反応することである。かくして、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、ポリペプチドは典型的には第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指示は、以下に記載のように、2つの分子またはその相補体が、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であることのさらに別の指示は、同じプライマーを使用してその配列を増幅することができることである。

【0069】

用語「核酸」は、本明細書では、用語「ポリヌクレオチド」と互換的に使用され、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのプライマーを指す。この用語は、合成である、天然である、および非天然である、参照核酸と類似する結合特性を有する、ならびに参照ヌクレオチドと類似する様式で代謝される、公知のヌクレオチド類似体または改変された骨格残基もしくは結合を含有する核酸を包含する。そのような類似体の例としては、限定されるものではないが、ホスホロチオエート (phosphorothioate)、ホスホルアミデート (phosphoroamidate)、メチルホスホン酸、キラルーメチルホスホン酸、2-Ο-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸 (PNA) が挙げられる。

【0070】

別途指摘しない限り、特定の核酸配列は、保存的に改変されたそのバリエーション（例えば、縮重コドン置換）および相補配列、ならびに明示的に示される配列も暗示的に包含する。特に、以下に詳述されるように、1または複数の選択された（または全ての）コドンの第3の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより、縮重コドン置換を達成することができる (Batzer et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al., (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; およびRossolini et al., (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

【0071】

核酸の文脈における用語「作動可能に連結された」とは、2つ以上のポリヌクレオチド（例えば、DNA）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、それは、転写される配列に対する転写調節配列の機能的関係を指す。例えば、プロモーターまたはエンハンサー配列が適切な宿主細胞または他の発現系においてコード配列の転写を刺激またはモジュ

レートする場合、それはコード配列に作動可能に連結されている。一般に、転写される配列に作動可能に連結されたプロモーター転写調節配列は、転写される配列に対して物理的に連続している、すなわち、それらは *c i s* 作用性である。しかしながら、エンハンサーなどのいくつかの転写調節配列は、それらが転写を増強するコード配列に対して物理的に連続しているか、またはそれに近接して位置する必要はない。

【0072】

用語「ポリペプチド」と「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーを指すように本明細書では互換的に使用される。この用語は、1または複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用される。別途指摘しない限り、特定のポリペプチド配列は、保存的に改変されたそのバリエーションも暗示的に包含する。

10

【0073】

本明細書で使用される用語「イムノコンジュゲート」または「抗体薬物コンジュゲート」または「コンジュゲート」は、抗体またはその抗原結合性断片と、化学療法剤、毒素、免疫治療剤、画像化プローブなどの別の薬剤との連結を指す。連結は、共有結合、または静電力などを介する非共有相互作用であってもよい。当業界で公知の様々なリンカーを使用して、イムノコンジュゲートを形成させることができる。さらに、イムノコンジュゲートを、イムノコンジュゲートをコードするポリヌクレオチドから発現させることができる融合タンパク質の形態で提供することができる。本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」とは、別々のタンパク質（ペプチドおよびポリペプチドを含む）を元々コードしていた2つ以上の遺伝子または遺伝子断片の連結により作出されるタンパク質を指す。融合遺伝子の翻訳は、元のタンパク質の各々から誘導される機能特性を有する単一のタンパク質をもたらす。

20

【0074】

「塩（単数）」または「塩（複数）」という用語は、化合物の酸付加または塩基付加塩、例えば、本発明の抗体薬物コンジュゲートと組み合わせて投与される別の治療剤である化合物を指す。「塩」は、特に「薬学的に許容される塩」を含む。「薬学的に許容される塩」という用語は、化合物の生物学的有効性および特性を保持し、通常、生物学的に、または他の点で望ましくない塩を指す。多くの場合、化合物は、アミノ基および／またはカルボキシル基またはそれらに類似した基の存在によって酸および／または塩基の塩を形成することが可能である。

30

【0075】

用語「対象」は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、および爬虫類を含む。注記しない限り、用語「患者」または「対象」は、互換的に本明細書に使用される。

【0076】

本明細書で使用される用語「細胞毒素」または「細胞毒性剤」は、細胞の成長および増殖にとって有害であり、細胞または悪性腫瘍を減少させる、阻害する、または破壊するように作用することができる任意の薬剤を指す。

40

【0077】

本明細書で使用される用語「抗がん剤」とは、限定されるものではないが、細胞毒性剤、化学療法剤、放射線療法および放射線療法剤、標的化抗がん剤、ならびに免疫治療剤などの、がんなどの細胞増殖障害を処置するために使用することができる任意の薬剤を指す。

【0078】

本明細書で使用される用語「薬物部分」または「ペイロード」とは、本発明の抗体または抗原結合性断片にコンジュゲートされ、任意の治療剤または診断剤、例えば、抗がん剤、抗炎症剤、抗感染剤（例えば、抗真菌剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤）、または麻酔剤を含んでもよい化学部分を指す。例えば、薬物部分は、細胞毒のような抗がん

50

剤であり得る。特定の実施形態では、薬物部分は、V-A T P a s e 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、I A P 阻害剤、m T o r 阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、オーリス タチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、M e t A P (メチオニンアミノペプチダーゼ)、タンパク質C R M 1 の核輸送の阻害剤、D P P I V 阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、C D K 2 阻害剤、C D K 9 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、キネシン阻害剤、H D A C 阻害剤、D N A 損傷剤、D N A アルキル化剤、D N A 挿入剤、D N A 副溝結合剤およびD H F R 阻害剤から選択される。これらの各々を、抗体と適合するリンカーに結合させるための方法および本発明の方法は、当業界で公知である。例えば、Singh et al., (2009) Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols, vol. 525, 445-457を参照されたい。さらに、ペイロードは、生物物理学的プローブ、フルオロフォア、スピン標識、赤外線プローブ、親和性プローブ、キレート剤、分光プローブ、放射性プローブ、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、スピン標識、D N A、R N A、タンパク質、ペプチド、表面、抗体、抗体断片、ナノ粒子、量子ドット、リボソーム、P L G A 粒子、サッカリドまたはポリサッカリドであってもよい。

【0079】

用語「メイタンシノイド薬物部分」は、メイタンシノイド化合物の構造を有する抗体薬物コンジュゲートの下部構造を意味する。メイタンシノイドは、東アフリカの低木メイテナス・セラタ (Maytenus serrata) から初めて単離された (米国特許第3, 896, 111号)。その後、ある特定の微生物も、メイタンシノールおよびC-3メイタンシノールエステルなどのメイタンシノイドを生成することが発見された (米国特許第4, 151, 042号)。合成メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体が報告されている。米国特許第4, 137, 230号; 第4, 248, 870号; 第4, 256, 746号; 第4, 260, 608号; 第4, 265, 814号; 第4, 294, 757号; 第4, 307, 016号; 第4, 308, 268号; 第4, 308, 269号; 第4, 309, 428号; 第4, 313, 946号; 第4, 315, 929号; 第4, 317, 821号; 第4, 322, 348号; 第4, 331, 598号; 第4, 361, 650号; 第4, 364, 866号; 第4, 424, 219号; 第4, 450, 254号; 第4, 362, 663号; および第4, 371, 533号、ならびにKawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (それぞれ参照により明示的に組み込まれる) を参照されたい。コンジュゲーションにとって有用な特定のメイタンシノイドの例としては、D M 1、D M 3 および D M 4 が挙げられる。

【0080】

「腫瘍」とは、悪性であっても、または良性であっても、新生物性細胞成長および増殖、ならびに全ての前がん性およびがん性細胞および組織を指す。

【0081】

用語「抗腫瘍活性」は、腫瘍細胞の増殖、生存能力、または転移活性の速度の低下を意味する。例えば、抗腫瘍活性は、治療中に生じる異常細胞の成長速度の低下または腫瘍サイズの安定性もしくは低減、または治療法を用いない対照と比較した場合の治療法に起因したより長い生存により示され得る。そのような活性を、限定されるものではないが、異種移植片モデル、同種移植モデル、M M T V モデル、および抗腫瘍活性を調査するための当業界で公知の他のモデルなどの *i n v i t r o* または *i n v i v o* 腫瘍モデルにおいて受け入れられるものを使用して評価することができる。

【0082】

用語「悪性腫瘍」とは、非良性腫瘍またはがんを指す。本明細書で使用される用語「がん」は、脱調節された、または制御されない細胞成長を特徴とする悪性腫瘍を含む。例示的ながんとしては、がん腫、肉腫、白血病、およびリンパ腫が挙げられる。

【0083】

用語「がん」は、原発性悪性腫瘍 (例えば、細胞が元の腫瘍部位以外の対象の身体部位に移動していないもの) および二次悪性腫瘍 (例えば、元の腫瘍部位とは異なる第2の部

位への腫瘍細胞の移動である転移から生じるもの)を含む。

【0084】

「FGFR2」という用語は、受容体チロシンキナーゼスーパーファミリーの成員である線維芽細胞増殖因子受容体2を指す。FGFR2の核酸およびアミノ酸配列は公知であり、GenBank受託番号NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2で公開されている。構造的には、FGFR2アミノ酸配列は、切断されるシグナルペプチド、少なくとも1つまたは複数の免疫グロブリン(Ig)様ドメイン、酸性ボックス、膜貫通ドメイン、およびスプリットチロシンキナーゼドメインを有する受容体チロシンキナーゼタンパク質であり、その完全長にわたって、GenBank受託番号NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2のアミノ酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。構造的には、FGFR2核酸配列は、その完全長にわたって、GenBank受託番号NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2の核酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。

【0085】

「FGFR4」という用語は、受容体チロシンキナーゼスーパーファミリーの成員である線維芽細胞増殖因子受容体4を指す。FGFR4の核酸およびアミノ酸配列は公知であり、GenBank受託番号NM_002011.3、NM_022963.2、NM_213647.1で公開されている。構造的には、FGFR4アミノ酸配列は、切断されるシグナルペプチド、3つの免疫グロブリン(Ig)様ドメイン、酸性ボックス、膜貫通ドメイン、およびスプリットチロシンキナーゼドメインを有する受容体チロシンキナーゼタンパク質であり、その完全長にわたって、GenBank受託番号NM_002011.3、NM_022963.2、NM_213647.1のアミノ酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。構造的には、FGFR4核酸配列は、その完全長にわたって、GenBank受託番号NM_002011.3、NM_022963.2、NM_213647.1の核酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。

【0086】

「FGFR2/4」という用語は、FGFR2およびFGFR4を指すのに本明細書中で使用される。例えば、FGFR2/4に結合する抗体は、FGFR2およびFGFR4に結合する抗体を指す。

【0087】

「FGFR2発現性がん」または「FGFR2陽性がん」という用語は、がん細胞の表面上にFGFR2またはFGFR2の突然変異形態を発現するがんを指す。「FGFR4発現性がん」または「FGFR4陽性がん」という用語は、がん細胞の表面上にFGFR4またはFGFR4の突然変異形態を発現するがんを指す。

【0088】

「チロシンキナーゼ耐性がん」または「チロシンキナーゼ耐性腫瘍」という用語は、(1)開始するケアチロシンキナーゼ処置の規格に応答せず、「新生耐性」と称されるがん

10

20

30

40

50

または腫瘍、または（２）最初はケアチロシンキナーゼ処置の規格に応答し、古い、および／または新しい病変または伝播の再出現により決定されるように、その後進行するがんまたは腫瘍を指し、これらはまた、「二次耐性」または「再発したがん」とも称される。

【0089】

「Her2耐性がん」または「Her2耐性腫瘍」という用語は、（１）開始するケアHer2処置の規格に応答せず、「新生耐性」と称されるがんまたは腫瘍、または（２）最初はケアHer2処置の規格に応答し、古い、および／または新しい病変または伝播の再出現により決定されるように、その後進行するがんまたは腫瘍を指し、これらはまた、「二次耐性」または「再発したがん」とも称される。

【0090】

本明細書で使用される場合、任意の疾患または障害の用語「処置する（治療する（treat））」、「処置すること（治療すること（treating））」または「処置（治療（treatment））」とは、一実施形態では、疾患または障害を改善すること（すなわち、疾患または少なくとも１つのその臨床症状の発生を減速させるか、または停止させるか、または軽減すること）を指す。別の実施形態では、「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、患者によって認識できないものを含む少なくとも１つの物理的パラメーターを軽減または改善することを指す。さらに別の実施形態では、「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、疾患または障害を、物理的に（例えば、認識できる症状の安定化）、生理的に（例えば、物理的パラメーターの安定化）、またはその両方で調節することを指す。さらに別の実施形態では、「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、疾患または障害の開始または発生または進行を遅延させることを指す。

【0091】

用語「治療的に許容される量」または「治療有効用量」は、所望の結果（すなわち、腫瘍サイズの低下、腫瘍成長の阻害、転移の防止、ウイルス、細菌、真菌または寄生虫感染の阻害または防止）を得るのに十分な量を互換的に指す。いくつかの実施形態では、治療的に許容される量は、望ましくない副作用を誘導しない、または引き起こさない。幾つかの実施形態では、治療上許容される量は、副作用（但し、患者の状態を考慮して、医療機関により許容されるもののみ）を誘導するか、またそれを引き起こす。治療的に許容される量を、最初は低用量を投与し、次いで、所望の効果が達成されるまでその用量を徐々に増加させることにより決定することができる。「予防有効用量」および「治療有効用量」の本発明の分子は、がんに関連する症状などの疾患症状の、それぞれ、開始を防止するか、またはその重症度の低下をもたらし得る。

【0092】

用語「同時投与する」とは、個体の血液中の２つの活性薬剤の存在を指す。同時投与される活性薬剤を、同時に、または連続的に送達することができる。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図１】図１は、組換えヒトFGFR2 I I I bに対する抗体パネルに関する親和性推定値を示す。

【図２】図２（Ａ）～図２（Ｂ）は、抗FGFR抗体の、B a f－FGFR2受容体系においてアゴニストとして作用する能力を示す。

【図３】図３（Ａ）～図３（Ｂ）は、抗FGFR抗体の、B a f－FGFR2受容体系においてアンタゴニストとして作用する能力を示す。

【図４－１】図４（Ａ）～図４（Ｂ）は、S N U 1 6腫瘍異種移植片マウスモデルにおける抗FGFR2－および抗FGFR2／4－M C C－D M 1 A D Cの抗腫瘍活性を示す。

【図４－２】図４（Ａ）～図４（Ｂ）は、S N U 1 6腫瘍異種移植片マウスモデルにおける抗FGFR2－および抗FGFR2／4－M C C－D M 1 A D Cの抗腫瘍活性を示す。

【図４－３】図４（Ｃ）は、S M C C－D M 1およびS P D B－D M 4リンカー－ペイロ

10

20

30

40

50

ードにコンジュゲートされるADCとしての12433抗体の抗腫瘍活性を示し、図4(D)～図4(E)は、抗FGFR2-および抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADCの薬物動態特性を示す。

【図4-4】図4(D)～図4(E)は、抗FGFR2-および抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADCの薬物動態特性を示す。

【図4-5】図4(F)は、抗FGFR2-および抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADCパネルに関するADCクリアランスに対する抗腫瘍活性を示す。

【図5】図5(A)～図5(C)は、2時間後のFGFR2で増幅させた細胞株SNU16(A)、2～72時間後のFGFR2で増幅させた細胞株SNU16(B)またはKato-III細胞(C)におけるFGFRシグナル伝達および総合的な受容体発現を調節する能力を示すウェスタンブロットである。 10

【図6-1】図6(A)～図6(D)は、12425-MCC-DM1の、IgGおよび遊離ペイロード対照に対するSNU-16(A)、Kato-III(B)またはNUGC3(C)細胞の増殖を阻害する能力を示し、図6(D)は、コンジュゲートされていない抗体12425が、いかなる感知可能な抗増殖効果も有さなかったことを示す。

【図6-2】図6(A)～図6(D)は、12425-MCC-DM1の、IgGおよび遊離ペイロード対照に対するSNU-16(A)、Kato-III(B)またはNUGC3(C)細胞の増殖を阻害する能力を示し、図6(D)は、コンジュゲートされていない抗体12425が、いかなる感知可能な抗増殖効果も有さなかったことを示す。

【図7-1】図7(A)～図7(B)は、pHH3および切断されたカスパーゼ3発現の評価を示す12425-MCC-DM1による処置後のSNU-16(A)またはNUGC3(B)腫瘍異種移植片の画像である。 20

【図7-2】図7(A)～図7(B)は、pHH3および切断されたカスパーゼ3発現の評価を示す12425-MCC-DM1による処置後のSNU-16(A)またはNUGC3(B)腫瘍異種移植片の画像である。

【図8-1】図8(A)～図8(F)は、NCI-H716(A)、MFM223(B)、ヒト原発性胃腫瘍異種移植片(xenograph)(CHGA-010)(C)、ヒト原発性肺腫瘍異種移植片モデル(HLUX1228)(D)、ヒト原発性乳がん異種移植片モデル(E)およびヒト原発性乳管癌異種移植片モデル(F)の抗腫瘍活性を示す。

【図8-2】図8(A)～図8(F)は、NCI-H716(A)、MFM223(B)、ヒト原発性胃腫瘍異種移植片(CHGA-010)(C)、ヒト原発性肺腫瘍異種移植片モデル(HLUX1228)(D)、ヒト原発性乳がん異種移植片モデル(E)およびヒト原発性乳管癌異種移植片モデル(F)の抗腫瘍活性を示す。 30

【図8-3】図8(A)～図8(F)は、NCI-H716(A)、MFM223(B)、ヒト原発性胃腫瘍異種移植片(CHGA-010)(C)、ヒト原発性肺腫瘍異種移植片モデル(HLUX1228)(D)、ヒト原発性乳がん異種移植片モデル(E)およびヒト原発性乳管癌異種移植片モデル(F)の抗腫瘍活性を示す。

【図9】図9は、CHGA-119腫瘍異種移植片モデルにおける、単独での、およびFGFRチロシンキナーゼ阻害剤BGJ398と組み合わせた、抗FGFR2/4ADC、12425-MCC-DM1の抗腫瘍活性を示す。 40

【図10】図10は、SNU-16腫瘍異種移植片マウスモデルにおける、異なる用量およびスケジュールでの抗FGFR2/4ADC、12425-MCC-DM1の抗腫瘍活性を示す。

【図11-1】図11(A)～図11(C)は、抗FGFR2抗体の、Kato-III細胞において*in vitro*でADCCを誘導する能力(A)、Kato-III細胞においてC1qに結合する能力(B)、CDCを誘導する能力(C)の評価を示す。図11(D)は、*in vivo*でのコンジュゲートされていない抗体としてのADCC欠失変異体のまたはMCC-DM1とコンジュゲートされたADCの効果を示す。

【図11-2】図11(A)～図11(C)は、抗FGFR2抗体の、Kato-III細胞において*in vitro*でADCCを誘導する能力(A)、Kato-III細胞 50

においてC1qに結合する能力(B)、CDCを誘導する能力(C)の評価を示す。図11(D)は、*in vivo*でのコンジュゲートされていない抗体としてのADCC欠失変異体のまたはMCC-DM1とコンジュゲートされたADCの効果を示す。

【図11-3】図11(A)～図11(C)は、抗FGFR2抗体の、Kato III細胞において*in vitro*でADCCを誘導する能力(A)、Kato III細胞においてC1qに結合する能力(B)、CDCを誘導する能力(C)の評価を示す。図11(D)は、*in vivo*でのコンジュゲートされていない抗体としてのADCC欠失変異体のまたはMCC-DM1とコンジュゲートされたADCの効果を示す。

【図12】図12(A)～図12(B)は、抗FGFR抗体またはADCの、2時間後(A)または経時的に(B)、FGFR4発現性細胞株MDA-MB453におけるFGFRシグナル伝達および総合的な受容体発現を調節する能力を示すウェスタンブロットである。

【図13-1】図13(A)～図13(D)は、FGFR2またはFGFR2/4抗体(コンジュゲートされていないか、またはMCC-DM1 ADCとして)の、MDA-MB453(A)、RH4(B)、JR細胞(C)またはがん細胞株パネル(D)の増殖を阻害する能力を示す。

【図13-2】図13(A)～図13(D)は、FGFR2またはFGFR2/4抗体(コンジュゲートされていないか、またはMCC-DM1 ADCとして)の、MDA-MB453(A)、RH4(B)、JR細胞(C)またはがん細胞株パネル(D)の増殖を阻害する能力を示す。

【図13-3】図13(A)～図13(D)は、FGFR2またはFGFR2/4抗体(コンジュゲートされていないか、またはMCC-DM1 ADCとして)の、MDA-MB453(A)、RH4(B)、JR細胞(C)またはがん細胞株パネル(D)の増殖を阻害する能力を示す。

【図14】図14(A)～図14(C)は、pHH3および/または切断されたカスパーゼ3発現の評価を示す1245-MCC-DM1による処置後のMDA-MB453((A)および(B))またはRH4(C)腫瘍異種移植片の画像である。

【図15】図15(A)～図15(B)は、MDA-MB453(A)およびRH4(B)腫瘍異種移植片マウスモデルにおける抗FGFR2-および抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADCの抗腫瘍活性を示す。

【図16-1】図16(A)～図16(D)は、マウス((A)～(B))、ラット(C)またはカニクイザル(D)における1245-MCC-DM1のPKプロファイルを示す。

【図16-2】図16(A)～図16(D)は、マウス((A)～(B))、ラット(C)またはカニクイザル(D)における1245-MCC-DM1のPKプロファイルを示す。

【図17】図17(A)～図17(B)は、12425(20562-MCC-DM1)の操作変異体の、*in vitro*(A)および*in vivo*(B)でのSNU-16細胞の増殖を阻害する能力を示す。

【図18】図18(A)～図18(B)は、10164(20809-MCC-DM1)および12425(20811-MCC-DM1)の親和性成熟変異体の、*in vitro*(A)および*in vivo*(B)でのSNU-16細胞の増殖を阻害する能力を示す。

【図19-1】図19は、FGFR2に対する重水素交換実験の結果を示す。図19(A)は、6つの治療用mAbの非存在(対照)および存在下でのFGFR2に関する絶対的な重水素取込みを示す。バーの高さは、3回の測定の平均値であり、エラーバーは、1つの標準偏差であり、図19(B)は、mAb結合性FGFR2と対照FGFR2との間の重水素取込みの差を、測定における標準誤差で除算したものを示し、図19(C)は、FGFR2 IIIc:FGFR2結晶構造(PDB ID:1EV2)上へマッピングされたFGFR2へのmAbの結合時の高い保護の領域を示し、図19(D)は、FGFR

10

20

30

40

50

2 I I I b : F G F R 1 結晶構造 (P D B I D : 3 O J M) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示す。

【図 19-2】図 19 は、F G F R 2 に対する重水素交換実験の結果を示す。図 19 (A) は、6 つの治療用 m A b の非存在 (対照) および存在下での F G F R 2 に関する絶対的な重水素取込みを示す。バーの高さは、3 回の測定の平均値であり、エラーバーは、1 つの標準偏差であり、図 19 (B) は、m A b 結合性 F G F R 2 と対照 F G F R 2 との間の重水素取込みの差を、測定における標準誤差で除算したものを示し、図 19 (C) は、F G F R 2 I I I c : F G F R 2 結晶構造 (P D B I D : 1 E V 2) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示し、図 19 (D) は、F G F R 2 I I I b : F G F R 1 結晶構造 (P D B I D : 3 O J M) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示す。

10

【図 19-3】図 19 は、F G F R 2 に対する重水素交換実験の結果を示す。図 19 (A) は、6 つの治療用 m A b の非存在 (対照) および存在下での F G F R 2 に関する絶対的な重水素取込みを示す。バーの高さは、3 回の測定の平均値であり、エラーバーは、1 つの標準偏差であり、図 19 (B) は、m A b 結合性 F G F R 2 と対照 F G F R 2 との間の重水素取込みの差を、測定における標準誤差で除算したものを示し、図 19 (C) は、F G F R 2 I I I c : F G F R 2 結晶構造 (P D B I D : 1 E V 2) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示し、図 19 (D) は、F G F R 2 I I I b : F G F R 1 結晶構造 (P D B I D : 3 O J M) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示す。

20

【図 19-4】図 19 は、F G F R 2 に対する重水素交換実験の結果を示す。図 19 (A) は、6 つの治療用 m A b の非存在 (対照) および存在下での F G F R 2 に関する絶対的な重水素取込みを示す。バーの高さは、3 回の測定の平均値であり、エラーバーは、1 つの標準偏差であり、図 19 (B) は、m A b 結合性 F G F R 2 と対照 F G F R 2 との間の重水素取込みの差を、測定における標準誤差で除算したものを示し、図 19 (C) は、F G F R 2 I I I c : F G F R 2 結晶構造 (P D B I D : 1 E V 2) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示し、図 19 (D) は、F G F R 2 I I I b : F G F R 1 結晶構造 (P D B I D : 3 O J M) 上へマッピングされた F G F R 2 への m A b の結合時の高い保護の領域を示す。

【図 20-1】図 20 は、X 線結晶学エピトープマッピング研究からの結果を示す。図 20 (A) は、F G F R 2 への 1 2 4 2 5 F a b 結合の全体的な構造 (左パネル) および標識されたエピトープ残基を有する F G F R 2 上の詳細な相互作用表面 (右パネル) を示し、図 20 (B) は、F G F R 4 への 1 2 4 2 5 F a b 結合の全体的な構造 (左パネル) および標識されたエピトープ残基を有する F G F R 4 上の詳細な相互作用表面 (右パネル) を示し、図 20 (C) は、D 2 ドメインにおけるヒト F G F R 2 および F G F R 4 の配列アラインメントを示す。完全に保存される残基は、濃い灰色で影を付け、部分的に保存される残基は、薄い灰色で影を付ける。破線の四角は、F G F R 4 において、1 2 4 2 5 F a b を、それらの整列された対応物と一緒に接触している F G F R 2 残基である。

30

【図 20-2】図 20 は、X 線結晶学エピトープマッピング研究からの結果を示す。図 20 (A) は、F G F R 2 への 1 2 4 2 5 F a b 結合の全体的な構造 (左パネル) および標識されたエピトープ残基を有する F G F R 2 上の詳細な相互作用表面 (右パネル) を示し、図 20 (B) は、F G F R 4 への 1 2 4 2 5 F a b 結合の全体的な構造 (左パネル) および標識されたエピトープ残基を有する F G F R 4 上の詳細な相互作用表面 (右パネル) を示し、図 20 (C) は、D 2 ドメインにおけるヒト F G F R 2 および F G F R 4 の配列アラインメントを示す。完全に保存される残基は、濃い灰色で影を付け、部分的に保存される残基は、薄い灰色で影を付ける。破線の四角は、F G F R 4 において、1 2 4 2 5 F a b を、それらの整列された対応物と一緒に接触している F G F R 2 残基である。

40

【図 20-3】図 20 は、X 線結晶学エピトープマッピング研究からの結果を示す。図 20 (A) は、F G F R 2 への 1 2 4 2 5 F a b 結合の全体的な構造 (左パネル) および標識されたエピトープ残基を有する F G F R 2 上の詳細な相互作用表面 (右パネル) を示し

50

、図20(B)は、FGFR4への12425Fab結合の全体的な構造(左パネル)および標識されたエピトープ残基を有するFGFR4上の詳細な相互作用表面(右パネル)を示し、図20(C)は、D2ドメインにおけるヒトFGFR2およびFGFR4の配列アラインメントを示す。完全に保存される残基は、濃い灰色で影を付け、部分的に保存される残基は、薄い灰色で影を付ける。破線の四角は、FGFR4において、12425Fabを、それらの整列された対応物と一緒に接触しているFGFR2残基である。

【図21】図21は、*in vitro*で、SNU16細胞およびBGJ398耐性SNU16細胞の感度を、BGJ398またはゲフィニチブ($IC_{50} = 16.7 \text{ nM}$)と比較する増殖研究の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0094】

発明の詳細な説明

本発明は、FGFR2およびFGFR4の両方(「FGFR2/4」)に結合する抗体、抗体断片(例えば、抗原結合性断片)、および抗体薬物コンジュゲートを提供する。特に、本発明は、FGFR2/4に結合し、そのような結合の際に内在化する抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。本発明の抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を、抗体薬物コンジュゲートを生成するために使用することができる。さらに、本発明は、望ましい薬物動態特性および他の望ましい属性を有し、したがって、胃がん、乳がん、横紋筋肉腫(例えば、胞巣状横紋筋肉腫または胎児性横紋筋肉腫)、肝臓がん、副腎がん、肺がん、結腸がんおよび子宮内膜がんのようなFGFR2および/またはFGFR4を発現するがんを処置するのに使用され得る抗体薬物コンジュゲートを提供する。本発明はさらに、本発明の抗体薬物コンジュゲートを含む医薬組成物、ならびにがんの処置のためにそのような医薬組成物を作製し、使用方法を提供する。

【0095】

抗体薬物コンジュゲート

本発明は、FGFR2/4に特異的に結合する抗体、抗原結合性断片またはその機能的等価物が薬物部分に連結された、抗体薬物コンジュゲートを提供する。一態様では、本発明の抗体、抗原結合性断片またはその機能的等価物は、リンカーによる共有結合を介して、抗がん剤である薬物部分に連結される。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、有効用量の抗がん剤(例えば、細胞毒性剤)を、FGFR2および/またはFGFR4を発現する腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、より高い選択性(およびより低い有効用量)を達成することができる。

【0096】

一態様では、本発明は、式(I)：

$$Ab - (L - (D)_m)_n$$

(式中、Abは、本明細書に記載のFGFR2/4結合抗体を表し；

Lはリンカーであり；

Dは薬物部分であり；

mは1～8の整数であり；および

nは1～20の整数である)

のイムノコンジュゲートを提供する。一実施形態では、nは1～10、2～8、または2～5の整数である。特定の実施形態では、nは2、3または4である。いくつかの実施形態では、mは1である。他の実施形態では、mは2、3または4である。

【0097】

薬物と抗体の比率は特定のコンジュゲート分子については正確な値を有するが(例えば、式(I)中でmを掛けたn)、その値は、典型的には、コンジュゲーションステップと関連する、ある程度の不均等性のため、多くの分子を含有する試料を記述するために使用される場合には平均値であることが多いことを理解されたい。イムノコンジュゲートの試料に関する平均充填量を、本明細書では薬物と抗体の比率、または「DAR」と呼ぶ。幾つかの実施形態では、薬物がメイタンシノイドである場合、それは、「MAR」と称され

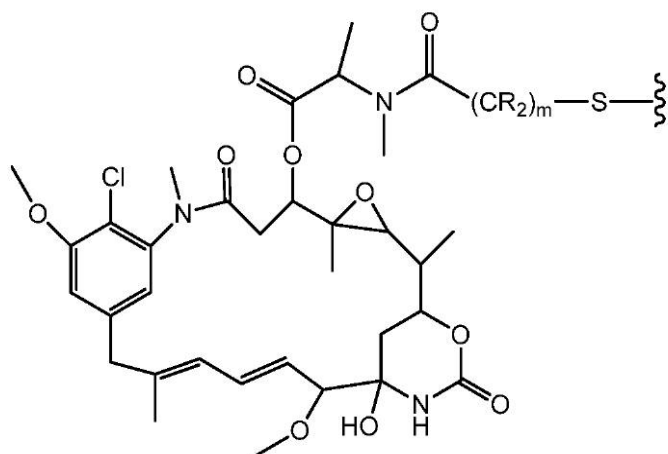
る。いくつかの実施形態では、DARは約1～約5であり、典型的には、約3、3.5、4、4.5または5である。いくつかの実施形態では、試料の少なくとも50重量%は、平均DAR±2を有する化合物であり、好ましくは、試料の少なくとも50%は、平均DAR±1を含有するコンジュゲートである。好ましい実施形態は、DARが約3.5であるイムノコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、「約n」のDARは、DARの測定値がnの20%以内にあることを意味する。

【0098】

本発明はまた、薬物部分に連結またはコンジュゲートされた、本明細書に開示される抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）およびその機能的等価物を含むイムノコンジュゲートに関する。一実施形態では、薬物部分Dは、構造：

【0099】

【化2】



（式中、波線は抗体薬物コンジュゲートのリンカーへのメイタンシノイドの硫黄原子の共有結合を示す）

を有するものなどの、メイタンシノイド薬物部分である。Rは、出現する毎に、独立にHまたはC₁～C₆アルキルである。アミド基を硫黄原子に結合させるアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルであってよい、すなわち、mは1、2または3である（米国特許第633,410号、米国特許第5,208,020号、Chari et al. (1992) Cancer Res. 52; 127-131、Lui et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623）。

【0100】

メイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体、すなわち、メイタンシノイドのキラル炭素でのRおよびS配置の任意の組合せが、本発明のイムノコンジュゲートについて企図される。一実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学を有する。

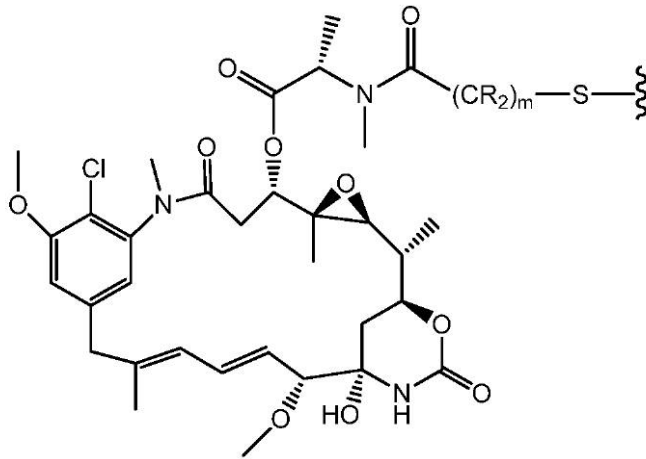
【0101】

10

20

30

【化 3】



10

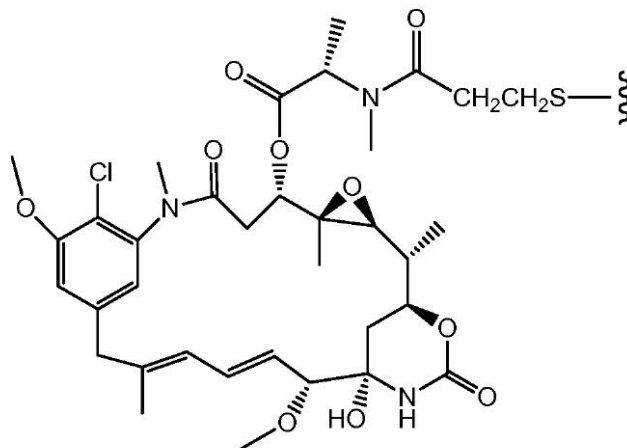
【0102】

一実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、 $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン (DM1としても知られる) である。DM1は、以下の構造式により表される。

【0103】

20

【化 4】



30

DM1

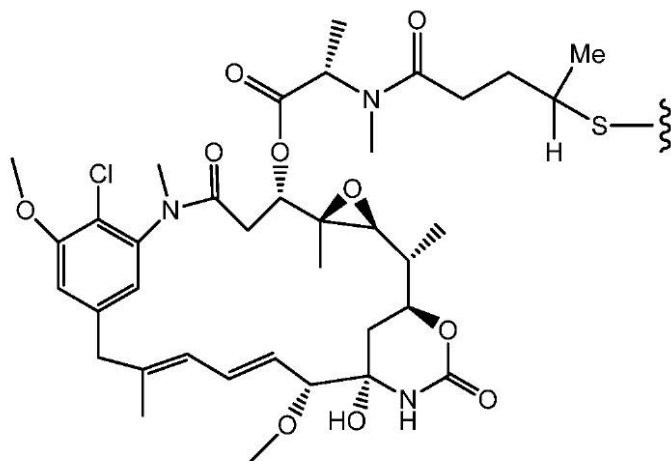
【0104】

別の実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、 $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン (DM3としても知られる) である。DM3は、以下の構造式により表される。

【0105】

40

【化 5】



DM3

10

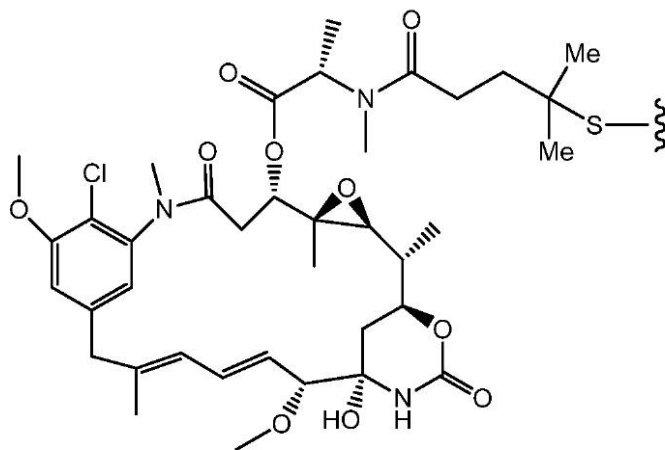
【0106】

別の実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、 $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(4-メチル-4-メルカプト-1-オキシペンチル)-メイタンシン (DM4としても知られる) である。DM4は、以下の構造式により表される。

20

【0107】

【化 6】



DM4

30

【0108】

薬物部分Dは、リンカーLによって抗体Abに連結され得る。Lは、共有結合によって薬物部分を抗体に連結することが可能な任意の化学部分である。架橋試薬は、薬物部分および抗体を連結して、抗体薬物コンジュゲートを形成するのに使用され得る二官能性または多官能性試薬である。抗体薬物コンジュゲートは、薬物部分および抗体への結合を可能にする反応官能性を有する架橋試薬を使用して調製することができる。例えば、システイン、チオールまたはアミン、例えばN末端またはアミノ酸鎖側鎖 (抗体のリシンのような) は、架橋試薬の官能基と結合を形成することができる。

40

【0109】

一実施形態では、Lは切断性リンカーである。別の実施形態では、Lは非切断性リンカーである。いくつかの実施形態では、Lは酸不安定リンカー、光不安定リンカー、ペプチダーゼ切断性リンカー、エステラーゼ切断性リンカー、ジスルフィド結合切断性リンカー、親水性リンカー、プロチャージリンカー、またはジカルボン酸に基づくリンカーである。

50

【0110】

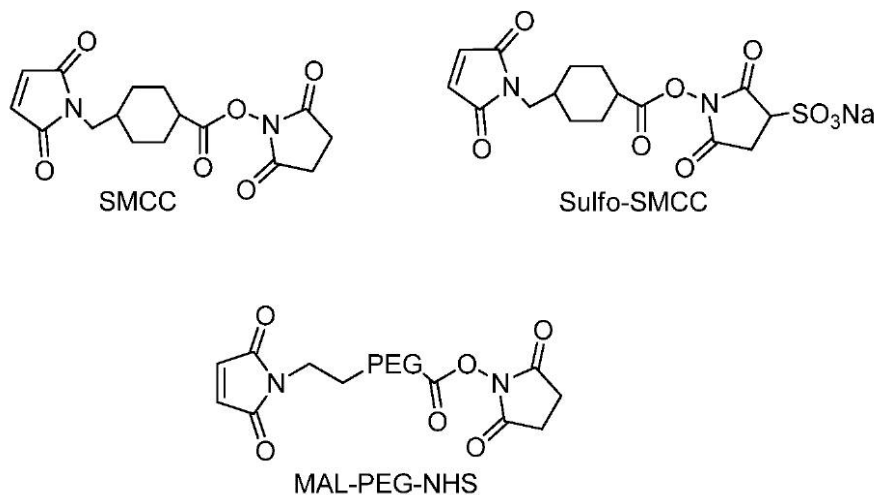
薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で非切断性リンカーを形成する好適な架橋試薬は当業界で周知であり、硫黄原子（SMCCなど）を含む非切断性リンカーまたは硫黄原子を含まないものを形成することができる。薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で非切断性リンカーを形成する好ましい架橋試薬は、マレイミドまたはハロアセチルに基づく部分を含む。本発明によれば、そのような非切断性リンカーは、マレイミドまたはハロアセチルに基づく部分から誘導されると言われる。

【0111】

マレイミドに基づく部分を含む架橋試薬としては、限定されるものではないが、N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート（SMCC）、スルホスクシンイミジル-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（スルホ-SMCC）、SMCCの「長鎖」類似体（LC-SMCC）であるN-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-（6-アミドカプロエート）、 κ -マレイミドウンデカン酸（undeconoic acid）N-スクシンイミジルエステル（KMUA）、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル（GMB S）、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（EMCS）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル（AMSA）、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート（SMPH）、N-スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート（SMPB）、N-(p-マレオミドフェニル)イソシアネート（PMIP）およびMAL-PEG-NHSなどのポリエチレングリコールスペーサを含有するマレイミドに基づく架橋試薬が挙げられる。これらの架橋試薬は、マレイミドに基づく部分から誘導される非切断性リンカーを形成する。マレイミドに基づく架橋試薬の代表的な構造は、以下に示される。

【0112】

【化7】



【0113】

別の実施形態では、リンカーLは、N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート（SMCC）、スルホスクシンイミジル-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（スルホ-SMCC）またはMAL-PEG-NHSから誘導される。

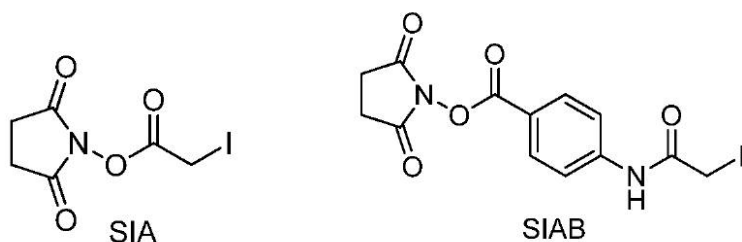
【0114】

ハロアセチルに基づく部分を含む架橋試薬としては、N-スクシンイミジルヨードアセテート（SIA）、N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（SIA B）、N-スクシンイミジルプロモアセテート（SBA）およびN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオネート（SBAP）が挙げられる。これらの架

橋試薬は、ハロアセチルに基づく部分から誘導される非切断性リンカーを形成する。ハロアセチルに基づく架橋試薬の代表的な構造は、以下に示される。

【0115】

【化8】



10

または

【0116】

一実施形態では、リンカーLは、N-スクシンイミジルヨードアセテート（SIA）またはN-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（SIAB）から誘導される。

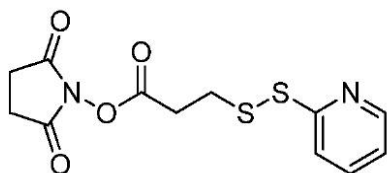
【0117】

薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で切断性リンカーを形成する好適な架橋試薬は、当業界で周知である。ジスルフィド含有リンカーは、生理的条件下で起こり得るジスルフィド交換を介して切断可能であるリンカーである。本発明によれば、そのような切断性リンカーは、ジスルフィドに基づく部分から誘導されると言われる。好適なジスルフィド架橋試薬としては、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）、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート（SPP）、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート（SPDB）およびN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)2-スルホブタノエート（スルホ-SPDB）が挙げられ、その構造は以下に示される。これらのジスルフィド架橋試薬は、ジスルフィドに基づく部分から誘導される切断性リンカーを形成する。

20

【0118】

【化9】

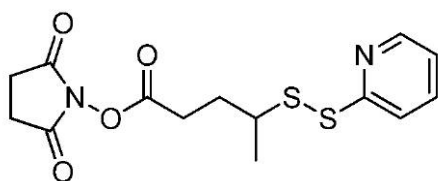


30

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）、

【0119】

【化10】

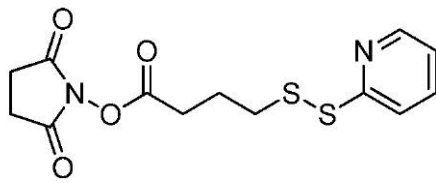


40

N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート（SPP）、

【0120】

【化 1 1】



N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート (SPDB) および
【0 1 2 1】

10

【化 1 2】



N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)2-スルホ-ブタノエート (スルホ-SPDB)。

20

【0 1 2 2】

一実施形態では、リンカーLは、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート (SPDB) から誘導される。

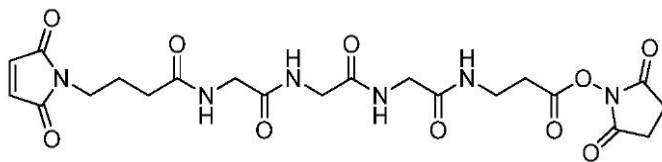
【0 1 2 3】

薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で荷電リンカーを形成する好適な架橋試薬は、プロチャージ架橋試薬として知られる。一実施形態では、リンカーLは、プロチャージ架橋試薬CX1-1から誘導される。CX1-1の構造は、以下の通りである。

【0 1 2 4】

【化 1 3】

30



2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル17-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5, 8, 11, 14-テトラオキソ-4, 7, 10, 13-テトラアザヘプタデカン-1-オエート (CX1-1)。

【0 1 2 5】

40

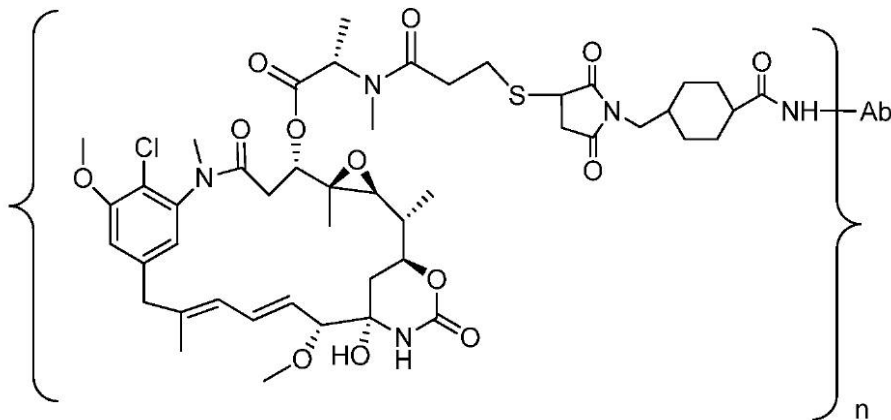
上記で表される架橋試薬はそれぞれ、架橋試薬の一方の末端に、抗体の第一級アミンと反応して、アミド結合を形成するNH-エステル、および他方の末端に、メイタンシノイド薬物部分のスルフィドリルと反応して、チオエーテルまたはジスルフィド結合を形成するマレイミド基またはピリジニルジスルフィド基を含有する。

【0 1 2 6】

1つの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、下記構造式のいずれか1つにより表される。

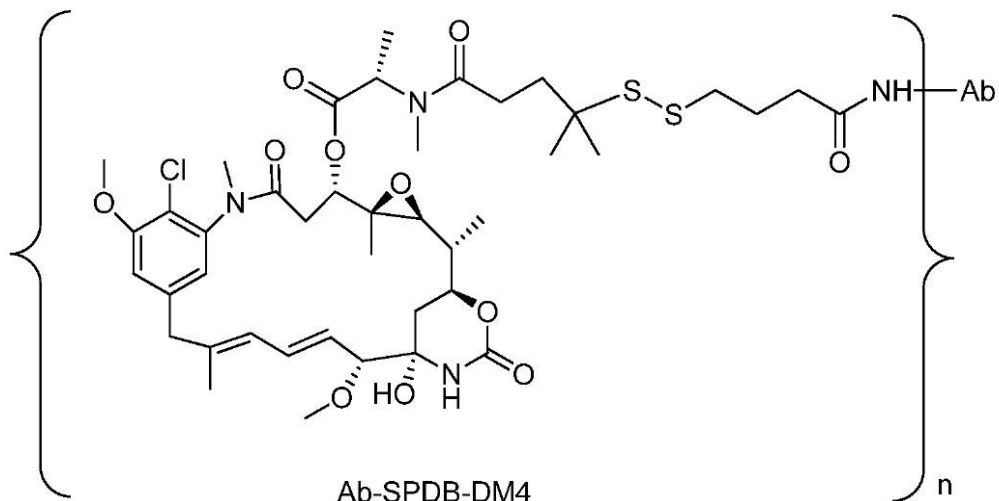
【0 1 2 7】

【化 1 4】



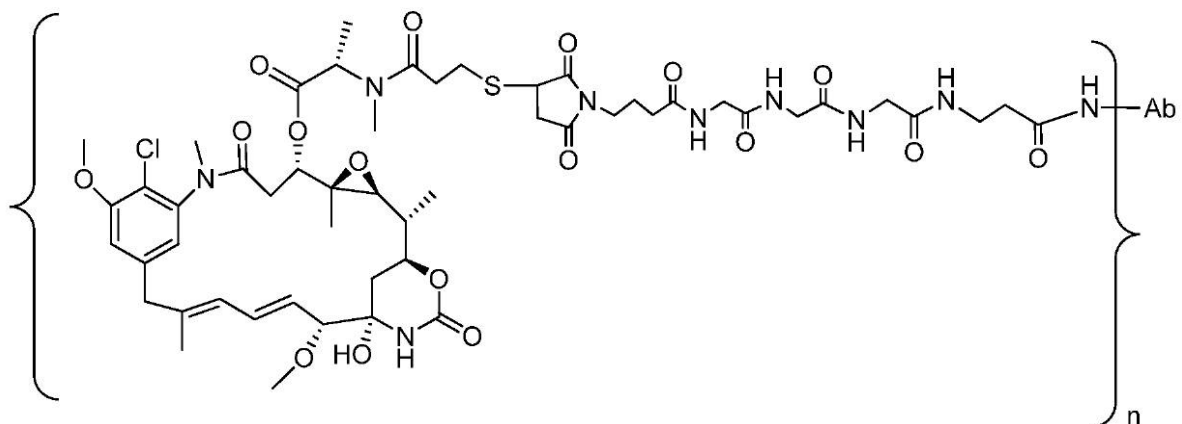
Ab-MCC-DM1

10



Ab-SPDB-DM4

20



Ab-CX1-1-DM1

30

40

式中、

AbはヒトFGFR2およびFGFR4の両方に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり；

アミド結合とAbの第1級アミンとの形成を介してAbに結合したD-L基の数を示すnは、1～20の整数である。一実施形態において、nは1～10、2～8または2～5の整数である。特定の実施形態において、nは3または4である。

【0128】

50

一実施形態では、コンジュゲート中の薬物（例えば、DM1またはDM4）と抗体との平均モル比（すなわち、メイタンシノイド抗体比（MAR）としても知られる、平均n値）は、約1～約10、約2～約8（例えば、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0または8.1）、約2.5～約7、約3～約5、約2.5～約4.5（例えば、約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5）、約3.0～約4.0、約3.2～約4.2、または約4.5～5.5（例えば、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4または約5.5）である。

10

【0129】

本発明の1つの態様では、本発明のコンジュゲートは、実質的に高い純度を有し、下記特色の1つまたは複数を含む：（a）約90%を上回る（例えば、約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を上回るか、またはそれに等しい）、好ましくは約95%を上回るコンジュゲート種が単量体であること、（b）コンジュゲート調製物中のコンジュゲートされていないリンカーレベルが、約10%未満であること（例えば、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%または0%未満であるか、それに等しい）（総リンカーに対して）、（c）10%未満のコンジュゲート種が架橋されること（例えば、約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%または0%未満であるか、またはそれに等しい）、（d）コンジュゲート調製物における遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）レベルが、約2%未満であること（例えば、約1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%または0%未満であるか、またはそれに等しい）（総細胞障害性作用物質に対するmol/mol）、および/または（e）遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）のレベルにおける実質的な増加が、貯蔵時に起こらないこと（例えば、約1週、約2週、約3週、約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、約1年、約2年、約3年、約4年または約5年後）。遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）のレベルにおける「実質的な増加」は、ある特定の貯蔵時間（例えば、約1週、約2週、約3週、約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、約1年、約2年、約3年、約4年または約5年）後に、遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）のレベルの増加が、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2.0%、約2.2%、約2.5%、約2.7%、約3.0%、約3.2%、約3.5%、約3.7%、または約4.0%未満であることを意味する。

20

30

40

【0130】

本明細書で使用される用語「非コンジュゲート化リンカー」とは、抗体がリンカーを介して薬物（例えば、DM1またはDM4）に共有的にカップリングしていない、架橋試薬（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）から誘導されるリンカーと共有的に連結された抗体を指す（すなわち、「非コンジュゲート化リンカー」はAb-MCC、Ab-SPDB、またはAb-CX1-1で表すことができる）。

【0131】

1. 薬物部分

50

本発明は、F G F R 2 / 4 に特異的に結合するイムノコンジュゲートを提供する。本発明のイムノコンジュゲートは、薬物部分、例えば、抗がん剤、自己免疫処置剤、抗炎症剤、抗真菌剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤、または麻酔剤にコンジュゲートされた抗 F G F R 2 / 4 抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を含む。本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、当業界で公知の任意の方法を使用して、いくつかの同一の、または異なる薬物部分にコンジュゲートすることができる。

【0132】

ある特定の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートの薬物部分は、V-A T P a s e 阻害剤、プロアポトーシス剤、B c l 2 阻害剤、M C L 1 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、I A P 阻害剤、m T o r 阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、オーリスタチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、M e t A P（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質 C R M 1 の核輸送の阻害剤、D P P I V 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、R N A ポリメラーゼ阻害剤、キナーゼ阻害剤、C D K 2 阻害剤、C D K 9 阻害剤、キネシン阻害剤、H D A C 阻害剤、D N A 損傷剤、D N A アルキル化剤、D N A 挿入剤、D N A 副溝結合剤および D H F R 阻害剤からなる群から選択される。

【0133】

一実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートの薬物部分は、限定されるものではないが、D M 1、D M 3 または D M 4 などのメイタンシノイド薬物部分である。

【0134】

さらに、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、所与の生物学的応答を改変する薬物部分にコンジュゲートすることができる。薬物部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドであってもよい。そのようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシン A、シュードモナス外毒素、コレラ毒素、もしくはジフテリア毒素などの毒素、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、サイトカイン、アポトーシス剤、抗血管新生剤などのタンパク質、または例えば、リンホカインなどの生物応答改変剤を含んでもよい。

【0135】

一実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物は、細胞毒素、薬物（例えば、免疫抑制剤）または放射性毒素などの薬物部分にコンジュゲートされる。細胞毒素の例としては、限定されるものではないが、タキサン（例えば、国際特許出願（P C T）W O 0 1 / 3 8 3 1 8 および P C T / U S 0 3 / 0 2 6 7 5 を参照されたい）、D N A アルキル化剤（例えば、C C - 1 0 6 5 類似体）、アントラサイクリン、ツブリシン（tubulysin）類似体、デュオカルマイシン類似体、オーリスタチン E、オーリスタチン F、メイタンシノイド、ならびに反応性ポリエチレングリコール部分（例えば、Sasse et al., J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000)、Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000)、Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)、Francisco et al., Blood (2003)（印刷出版物に先立って、電子出版物）、米国特許第 5, 475, 092 号、第 6, 340, 701 号、第 6, 372, 738 号、および第 6, 436, 931 号、米国特許出願公開第 2001/0036923 A1 号、係属中米国特許出願第 10/024, 290 号および第 10/116, 053 号、ならびに国際特許出願（P C T）W O 0 1 / 4 9 6 9 8 を参照されたい）を含む細胞毒性剤、タキソン、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、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、t. コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、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、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマ

イシンならびにその類似体または相同体が挙げられる。また、治療剤としては、例えば、代謝拮抗剤（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、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、削摩剤 (ablating agent)（例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メイファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、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 cis-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、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）およびドキシソルビシン）、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)）、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）も挙げられる（例えば、Seattle GeneticsのUS 20090304721を参照されたい）。

10

【0136】

本発明の抗体、抗体断片（抗原結合性断片）または機能的等価物にコンジュゲートすることができる細胞毒素の他の例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシンおよびオーリスタチン、ならびにその誘導体が挙げられる。

【0137】

治療剤を抗体にコンジュゲートするための様々な型の細胞毒素、リンカーおよび方法は、当業界で公知であり、例えば、Saito et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Krei 20
tman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264を参照されたい。

【0138】

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、放射性アイソトープにコンジュゲートして、放射性イムノコンジュゲートと呼ばれる、細胞毒性放射性薬剤を作成することもできる。診断的または治療的に使用するために抗体にコンジュゲートすることができる放射性アイソトープの例としては、限定されるものではないが、ヨウ素-131、インジウム-111、イットリウム-90、およびルテチウム-177が挙げられる。放射性イムノコンジュゲートを調製するための方法は、当業界で確立されている。放射性イムノコンジュゲートの例は、Zevalin（登録商標）(DEC P 30
harmaceuticals) および Bexxar（登録商標）(Corixa Pharmaceuticals) など、商業的に入手可能であり、同様の方法を使用して、本発明の抗体を使用して放射性イムノコンジュゲートを調製することができる。ある特定の実施形態では、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体に結合させることができる1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸 (DOTA) である。そのようなリンカー分子は、当業界で一般に公知であり、それぞれ全体が参照により組み込まれる、Denardo et al., (1998) Clin Cancer Res. 4(10):24 40
83-90; Peterson et al., (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; および Zimmerman et al., (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載されている。

【0139】

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、異種タンパク質またはポリペプチド（またはその断片、好ましくは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド）にコンジュゲートして、融合タンパク質を作成することもできる。特に、本発明は、本明細書に記載の抗体断片（例えば、抗原結合性断片）（例えば、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)2断片、VHドメイン、VH CDR、VLドメインまたはVL CDR）と、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。

【0140】

50

さらなる融合タンパク質を、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エクソンシャッフリング、および／またはコドンシャッフリング（集合的に、「DNAシャッフリング」と呼ばれる）の技術により作成することができる。DNAシャッフリングを使用して、本発明の抗体またはその断片の活性（例えば、より高い親和性およびより低い解離速度を有する抗体またはその断片）を変化させることができる。一般に、米国特許第5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号、および第5,837,458号; Patten et al., (1997) *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265-76; および Lorenzo and Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313（これらの特許および刊行物の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。抗体もしくはその断片、またはコードされた抗体もしくはその断片は、組換え前に変異性PCR、無作為ヌクレオチド挿入または他の方法により無作為突然変異誘発にかけることにより変化させることができる。抗原に特異的に結合する抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドを、1または複数の異種分子の、1または複数の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などと組み換えることができる。

【0141】

さらに、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、ペプチドなどのマーカー配列にコンジュゲートして、精製を容易にすることができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、特に、pQEベクター（QIAGEN（登録商標）, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）に提供されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドであり、その多くが商業的に入手可能である。Gentz et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824に記載のように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の好都合の精製を提供する。精製にとって有用な他のペプチドタグとしては、限定されるものではないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質から誘導されるエピトープに対応するヘマグルチニン（「HA」）タグ（Wilson et al., (1984) *Cell* 37:767）、および「FLAG（登録商標）」タグ（A. Einhauser et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455-465, 2001）が挙げられる。本発明によれば、抗体または抗原結合性断片を、腫瘍浸透ペプチドにコンジュゲートして、その効能を増強することもできる。

【0142】

他の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物は、診断剤または検出剤にコンジュゲートされる。そのようなイムノコンジュゲートは、特定の療法の効能の決定などの、臨床試験手順の一部として疾患または障害の開始、発生、進行および／または重症度をモニタリングまたは予後診断するのに有用であり得る。そのような診断および検出を、限定されるものではないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの様々な酵素；限定されるものではないが、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子族；限定されるものではないが、Alexa Fluor（登録商標）350、Alexa Fluor（登録商標）405、Alexa Fluor（登録商標）430、Alexa Fluor（登録商標）488、Alexa Fluor（登録商標）500、Alexa Fluor（登録商標）514、Alexa Fluor（登録商標）532、Alexa Fluor（登録商標）546、Alexa Fluor（登録商標）555、Alexa Fluor（登録商標）568、Alexa Fluor（登録商標）594、Alexa Fluor（登録商標）610、Alexa Fluor（登録商標）633、Alexa Fluor（登録商標）647、Alexa Fluor（登録商標）660、Alexa Fluor（登録商標）680、Alexa Fluor（登録商標）700、Alexa Fluor（登録商標）750、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリ

ドまたはフィコエリトリンなどの蛍光材料；限定されるものではないが、ルミノールなどの発光材料；限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどの生物発光材料；限定されるものではないが、ヨウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、および ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、および ^{111}In)、テクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{64}Cu 、 ^{113}Sn 、および ^{117}Sn などの放射性材料；ならびに様々なポジトロン放出断層撮影を使用するポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンなどの、検出可能物質に抗体をカップリングさせることにより達成することができる。

10

【0143】

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、標的抗原のイムノアッセイまたは精製にとって特に有用である固相支持体に結合することもできる。そのような固相支持体としては、限定されるものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

20

【0144】

2. リンカー

本明細書で使用される場合、「リンカー」は、薬物部分などの別の部分に、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を連結することができる任意の化学部分である。幾つかの場合で、リンカーの一部が、メイタンシノイドにより供給される。例えば、チオール含有メイタンシノイドであるDM1は、天然メイタンシノイドの誘導体であり、リンカーの一部を供給する。メイタンシンのC-3水酸基にある側鎖は、CO-CH₃に終わり、DM1の側鎖は、CO-CH₂-CH₂-SHに終わる。したがって、最終的なリンカーは、2つの片、即ち抗体へ導入される架橋試薬およびDM1由来の側鎖から構築される。リンカーは、化合物または抗体が活性を保持する条件下で、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断、およびジスルフィド結合切断などの切断の影響を受けやすいものであってもよい（切断性リンカー）。あるいは、リンカーは、切断に対して実質的に耐性であってもよい（例えば、安定性リンカーまたは非切断性リンカー）。いくつかの態様では、リンカーは、プロチャージリンカー、親水性リンカー、またはジカルボン酸に基づくリンカーである。

30

【0145】

非切断性リンカーは、安定な、共有的な様式でメイタンシノイドなどの薬物を、抗体に連結することができ、切断性リンカーについて上記に列挙されたカテゴリーの下から外れない任意の化学部分である。かくして、非切断性リンカーは、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断およびジスルフィド結合切断に対して実質的に耐性である。さらに、非切断性とは、メイタンシノイドなどの薬物または抗体がその活性を喪失しない条件下で、酸、光不安定性切断剤、ペプチダーゼ、エステラーゼ、またはジスルフィド結合を切断する化学的もしくは生理的化合物により誘導される切断に耐える、リンカー中の、またはリンカーに隣接する化学的結合の能力を指す。

40

【0146】

ジスルフィド含有リンカーは、ジスルフィド交換によって切断可能なリンカーであり、これは、生理学的条件下で起こり得る。酸不安定リンカーは、酸性pHで切断可能なリンカーである。例えば、エンドソームおよびリソソームなどの特定の細胞内区画は、酸性pH（pH 4～5）を有し、酸不安定リンカーを切断するのに好適な条件を提供する。

【0147】

50

光不安定リンカーは、光に接近可能である体表面で、および多くの体腔において有用であるリンカーである。さらに、赤外線は組織に浸透することができる。

【0148】

いくつかのリンカーは、ペプチダーゼ、すなわち、ペプチダーゼ切断性リンカーにより切断することができる。特定のペプチドのみが、細胞の内部または外部で容易に切断される。例えば、Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982)およびUmemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989)を参照されたい。さらに、ペプチドは、 α -アミノ酸と、化学的には、あるアミノ酸のカルボキシレート基と、第2のアミノ酸のアミノ基との間のアミド結合であるペプチド結合とから構成される。リシンのカルボキシレート基および ϵ -アミノ基との間の結合などの他のアミド結合は、ペプチド結合ではないと理解され、非切断性であると考えられる。

10

【0149】

いくつかのリンカーは、エステラーゼにより切断することができる、すなわち、エステラーゼ切断性リンカーである。再度、特定のエステルのみを、細胞の内部または外部に存在するエステラーゼにより切断することができる。エステルは、カルボン酸とアルコールとの縮合により形成される。単純エステルは、脂肪族アルコール、ならびに小環状および低分子芳香族アルコールなどの、単純アルコールを使用して生成されるエステルである。

【0150】

プロチャージリンカーは、抗体薬物コンジュゲートへの組込み後にその電荷を保持する荷電した架橋試薬から誘導される。プロチャージリンカーの例を、US 2009/0274713に見出すことができる。

20

【0151】

一態様では、本発明で使用されるリンカーは、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)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート (SPP)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート (SPDB)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート (スルホ-SPDB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (SIA)、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート (SIA B)、マレイミドPEG NHS、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スルホスクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ-SMCC) または2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル17-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5, 8, 11, 14-テトラオキソ-4, 7, 10, 13-テトラアザヘプタデカン-1-オエート (CX1-1) などの架橋試薬から誘導される。別の態様では、本発明で使用されるリンカーは、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)、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スルホスクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ-SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート (スルホ-SPDB) または2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル17-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5, 8, 11, 14-テトラオキソ-4, 7, 10, 13-テトラアザヘプタデカン-1-オエート (CX1-1) などの架橋剤から誘導される。

30

40

【0152】

3. ADCのコンジュゲーションおよび調製

本発明のコンジュゲートを、米国特許第7, 811, 572号、第6, 411, 163号、第7, 368, 565号、および第8, 163, 888号、ならびに米国特許出願公開第2011/0003969号、第2011/0166319号、第2012/0253021号および第2012/0259100号に記載のものなどの当業界で公知の任意の方法により調製することができる。これらの特許および特許出願公開の全教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0153】

1ステッププロセス

一実施形態では、本発明のコンジュゲートを、1ステッププロセスによって調製することができる。このプロセスは、実質的に水性の媒体中で抗体、薬物および架橋剤を混合すること、任意選択で、好適なpHで1または複数の共溶媒を含有させることを含む。一実施形態では、プロセスは、本発明の抗体を、薬物（例えば、DM1またはDM4）と接触させて、抗体と薬物とを含む第1の混合物を形成させるステップ、次いで、約4～約9のpHを有する溶液中で、抗体と薬物とを含む第1の混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させて、（i）コンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、またはAb-CX1-1-DM1）、（ii）遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）、および（iii）反応副生成物を含む混合物を提供するステップを含む。

10

【0154】

一実施形態では、1ステッププロセスは、約6以上（例えば、約6～約9、約6～約7、約7～約9、約7～約8.5、約7.5～約8.5、約7.5～約8.0、約8.0～約9.0、または約8.5～約9.0）のpHを有する溶液中で、抗体を、薬物（例えば、DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させることを含む。例えば、本発明のプロセスは、約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.8、約7.9、約8.0、約8.1、約8.2、約8.3、約8.4、約8.5、約8.6、約8.7、約8.8、約8.9または約9.0のpHを有する溶液中で、細胞結合剤を、薬物（DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させることを含む。特定の実施形態では、本発明のプロセスは、約7.8のpH（例えば、7.6～8.0のpHまたは7.7～7.9のpH）を有する溶液中で、細胞結合剤を、薬物（例えば、DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させることを含む。

20

【0155】

1ステッププロセス（すなわち、抗体を薬物（例えば、DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させること）を、当業界で公知の任意の好適な温度で実行することができる。例えば、1ステッププロセスは、約20℃以下（例えば、約-10℃（例えば、細胞毒性剤および二官能性架橋試薬を溶解するために使用される有機溶媒の存在によって、溶液の凍結が防止されるという条件で）～約20℃、約0℃～約18℃、約4℃～約16℃）、または室温（例えば、約20℃～約30℃もしくは約20℃～約25℃）、または高温（例えば、約30℃～約37℃）で行ってもよい。一実施形態では、1ステッププロセスは、約16℃～約24℃（例えば、約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、または約25℃）の温度で行う。別の実施形態では、1ステッププロセスは、約15℃以下（例えば、約-10℃～約15℃、または約0℃～約15℃）の温度で実行される。例えば、プロセスは、例えば、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、スルホ-SPDB、SPDB、またはCX1-1）を溶解するために使用される有機溶媒（複数可）の存在によって、溶液の凍結が防止されるという条件で、約15℃、約14℃、約13℃、約12℃、約11℃、約10℃、約9℃、約8℃、約7℃、約6℃、約5℃、約4℃、約3℃、約2℃、約1℃、約0℃、約-1℃、約-2℃、約-3℃、約-4℃、約-5℃、約-6℃、約-7℃、約-8℃、約-9℃、または約-10℃の温度で、抗体を、薬物（例えば、DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB、またはCX1-1）と接触させることを含む。一実施形態では、プロセスは、約-10℃～

30

40

50

約 15℃、約 0℃～約 15℃、約 0℃～約 10℃、約 0℃～約 5℃、約 5℃～約 15℃、約 10℃～約 15℃、または約 5℃～約 10℃の温度で、抗体を、薬物（例えば、DM1 または DM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることを含む。別の実施形態では、プロセスは、約 10℃の温度（例えば、8℃～12℃の温度または 9℃～11℃の温度）で、抗体を、薬物（例えば、DM1 または DM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることを含む。

【0156】

一実施形態では、上記の接触は、抗体を提供した後、該抗体を薬物（例えば、DM1 または DM4）と接触させて、抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）とを含む第 1 の混合物を形成させ、次いで、抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）とを含む第 1 の混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることにより行われる。例えば、一実施形態では、抗体を反応容器中に提供し、薬物（例えば、DM1 または DM4）を反応容器に添加し（それによって、抗体を接触させる）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）を、抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）とを含む混合物に添加する（それによって、抗体と薬物とを含む混合物を接触させる）。一実施形態では、抗体を反応容器中に提供し、抗体を容器に提供する直後に、薬物（例えば、DM1 または DM4）を反応容器に添加する。別の実施形態では、抗体を反応容器中に提供し、抗体を容器に提供した後の時間間隔後（例えば、細胞結合剤を空間に提供した後約 5 分、約 10 分、約 20 分、約 30 分、約 40 分、約 50 分、約 1 時間、約 1 日以上後）に、薬物（例えば、DM1 または DM4）を反応容器に添加する。薬物（例えば、DM1 または DM4）を、迅速に（すなわち、約 5 分、約 10 分などの短い時間間隔以内に）またはゆっくりと（ポンプを使用するなど）添加することができる。

【0157】

次いで、抗体を薬物（例えば、DM1 もしくは DM4）と接触させた直後に、または抗体を薬物（例えば、DM1 もしくは DM4）と接触させた後のいくらか後の時点で（例えば、約 5 分～約 8 時間以上）、抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）を含む混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることができる。例えば、一実施形態では、抗体を含む反応容器への薬物（例えば、DM1 または DM4）の添加の直後に、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）を、抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）とを含む混合物に添加する。あるいは、抗体を薬物（例えば、DM1 または DM4）と接触させた後、約 5 分、約 10 分、約 20 分、約 30 分、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間以上で、抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）とを含む混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることができる。

【0158】

抗体と薬物（例えば、DM1 または DM4）とを含む混合物を架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させた後、反応を約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間、約 24 時間以上（例えば、約 30 時間、約 35 時間、約 40 時間、約 45 時間、または約 48 時間）進行させる。

【0159】

一実施形態では、1 ステッププロセスは、未反応の薬物（例えば、DM1 もしくは DM4）および／または未反応の架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、

スルホー S P D B もしくは C X 1 - 1) をクエンチするためのクエンチングステップをさらに含む。クエンチングステップは、典型的には、コンジュゲートの精製前に行われる。一実施形態では、混合物をクエンチング試薬と接触させることにより、混合物をクエンチする。本明細書で使用される場合、「クエンチング試薬」とは、遊離薬物（例えば、DM 1 もしくは DM 4）および／または架橋剤（例えば、SM C C、スルホー S M C C、S P D B、スルホー S P D B または C X 1 - 1）と反応する試薬を指す。一実施形態では、4 - マレイミド酪酸、3 - マレイミドプロピオン酸、N - エチルマレイミド、ヨードアセトアミド、またはヨードアセトアミドプロピオン酸などのマレイミドまたはハロアセトアミドクエンチング試薬を使用して、薬物（例えば、DM 1 または DM 4）中の任意の未反応の基（チオールなど）がクエンチされたことを確保することができる。クエンチングステップは、薬物（例えば、DM 1）の二量体化を防止するのに役立ち得る。二量体化した DM 1 は、除去するのが困難であり得る。極性の荷電したチオールクエンチング試薬（4 - マレイミド酪酸または 3 - マレイミドプロピオン酸など）を使用するクエンチングの際に、過剰の未反応の DM 1 は、精製ステップの間に共有的に連結したコンジュゲートから容易に分離することができる極性の荷電した水溶性付加物に変換される。非極性および中性チオールクエンチング試薬を使用するクエンチングを使用することもできる。一実施形態では、混合物を、未反応の架橋剤（例えば、SM C C、スルホー S M C C、S P D B、スルホー S P D B または C X 1 - 1）と反応するクエンチング試薬と接触させることにより、混合物をクエンチする。例えば、求核試薬を混合物に添加して、任意の未反応の S M C C をクエンチすることができる。好ましくは、求核試薬は、リシン、タウリンおよびヒドロキシルアミンなどの、アミノ基含有求核試薬である。

【0160】

好ましい実施形態では、反応（すなわち、抗体を、薬物（例えば、DM 1 または DM 4）、次いで、架橋剤（例えば、SM C C、スルホー S M C C、S P D B、スルホー S P D B または C X 1 - 1）と接触させること）を、混合物をクエンチング試薬と接触させた後、完了まで進行させる。これに関して、抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）とを含む混合物を架橋剤（例えば、SM C C、スルホー S M C C、S P D B、スルホー S P D B または C X 1 - 1）と接触させた後、クエンチング試薬を約 1 時間～約 48 時間（例えば、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間、約 24 時間または約 25 時間～約 48 時間）混合物に添加する。

【0161】

あるいは、混合物の pH を約 5.0（例えば、4.8、4.9、5.0、5.1 または 5.2）に低下させることにより、混合物をクエンチする。別の実施形態では、pH を 6.0 未満、5.5 未満、5.0 未満、4.8 未満、4.6 未満、4.4 未満、4.2 未満、4.0 未満に低下させることにより、混合物をクエンチする。あるいは、pH を、約 4.0（例えば、3.8、3.9、4.0、4.1 または 4.2）～約 6.0（例えば、5.8、5.9、6.0、6.1 または 6.2）、約 4.0～約 5.0、約 4.5（例えば、4.3、4.4、4.5、4.6 または 4.7）～約 5.0 に低下させる。一実施形態では、混合物の pH を 4.8 に低下させることにより、混合物をクエンチする。別の実施形態では、混合物の pH を 5.5 に低下させることにより、混合物をクエンチする。

【0162】

一実施形態では、1 ステッププロセスは、不安定に結合したリンカーを抗体から遊離させるための保持ステップをさらに含む。保持ステップは、コンジュゲートの精製前（例えば、反応ステップの後、反応ステップとクエンチングステップの間、またはクエンチングステップの後）に混合物を保持することを含む。例えば、プロセスは、（a）抗体を薬物（例えば、DM 1 または DM 4）と接触させて、抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）とを含む混合物を形成させるステップ；次いで、約 4～約 9 の pH を有する溶液中で、抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）とを含む混合物を、架橋剤（例えば、S M

CC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1)と接触させて、(i)コンジュゲート(例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4またはAb-CX1-1-DM1)、(ii)遊離薬物(例えば、DM1またはDM4)、および(iii)反応副生成物を含む混合物を提供するステップ、(b)ステップ(a)で調製された混合物を保持して、不安定に結合したリンカーを細胞結合剤から遊離させるステップ、ならびに(c)混合物を精製して、精製されたコンジュゲートを提供するステップを含む。

【0163】

別の実施形態では、プロセスは、(a)抗体を薬物(例えば、DM1またはDM4)と接触させて、抗体と薬物(例えば、DM1またはDM4)とを含む混合物を形成させるステップ;次いで、約4~約9のpHを有する溶液中で、抗体と薬物(例えば、DM1またはDM4)とを含む混合物を、架橋剤(例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1)と接触させて、(i)コンジュゲート、(ii)遊離薬物(例えば、DM1またはDM4)、および(iii)反応副生成物を含む混合物を提供するステップ、(b)ステップ(a)で調製された混合物をクエンチして、任意の未反応の薬物(例えば、DM1もしくはDM4)および/または未反応の架橋剤(例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1)をクエンチするステップ、(c)ステップ(b)で調製された混合物を保持して、不安定に結合したリンカーを細胞結合剤から遊離させるステップ、ならびに(d)混合物を精製して、精製されたコンジュゲート(例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4またはAb-CX1-1-DM1)を提供するステップを含む。

【0164】

あるいは、保持ステップを、コンジュゲートの精製後に実施した後、さらなる精製ステップを行うことができる。

【0165】

好ましい実施形態では、保持ステップの前に反応を完了まで進行させる。これに関して、保持ステップを、抗体と薬物(例えば、DM1またはDM4)とを含む混合物を架橋剤(例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1)と接触させた後、約1時間~約48時間(例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間または約24時間~約48時間)実施することができる。

【0166】

保持ステップは、好適な期間(例えば、約1時間~約1週間、約1時間~約24時間、約1時間~約8時間、または約1時間~約4時間)にわたって好適な温度(例えば、約0℃~約37℃)で溶液を維持して、安定に結合したリンカーを抗体から実質的に遊離させないが、不安定に結合したリンカーを抗体から遊離させることを含む。一実施形態では、保持ステップは、約20℃以下(例えば、約0℃~約18℃、約4℃~約16℃)、室温(例えば、約20℃~約30℃もしくは約20℃~約25℃)、または高温(例えば、約30℃~約37℃)で溶液を維持することを含む。一実施形態では、保持ステップは、約16℃~約24℃(例えば、約15℃、約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、または約25℃)の温度で溶液を維持することを含む。別の実施形態では、保持ステップは、約2℃~約8℃(例えば、約0℃、約1℃、約2℃、約3℃、約4℃、約5℃、約6℃、約7℃、約8℃、約9℃、または約10℃)の温度で溶液を維持することを含む。別の実施形態では、保持ステップは、約37℃(例えば、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃、または約40℃)の温度で溶液を維持することを含む。

【0167】

保持ステップの持続期間は、保持ステップが行われる温度およびpHに依存する。例え

ば、保持ステップの持続期間は、高温で保持ステップを行うことにより実質的に減少させることができ、その最大温度は細胞結合剤－細胞毒性剤コンジュゲートの安定性によって制限される。保持ステップは、約1時間～約1日（例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約12時間、約14時間、約16時間、約18時間、約20時間、約22時間、または約24時間）、約10時間～約24時間、約12時間～約24時間、約14時間～約24時間、約16時間～約24時間、約18時間～約24時間、約20時間～約24時間、約5時間～約1週間、約20時間～約1週間、約12時間～約1週間（例えば、約12時間、約16時間、約20時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、または約7日）または約1日～約1週間にわたって溶液を維持することを含んでもよい。

10

【0168】

一実施形態では、保持ステップは、少なくとも約12時間から最大で1週間までの期間にわたって約2℃～約8℃の温度で溶液を維持することを含む。別の実施形態では、保持ステップは、一晚（例えば、約12～約24時間、好ましくは、約20時間）、約2℃～約8℃の温度で溶液を維持することを含む。

【0169】

保持ステップのためのpH値は、好ましくは、約4～約10である。一実施形態では、保持ステップのためのpH値は、約4以上であるが、約6未満である（例えば、4～5.9）か、または約5以上であるが、約6未満である（例えば、5～5.9）。別の実施形態では、保持ステップのためのpH値は、約6～約10の範囲（例えば、約6.5～約9、約6～約8）である。例えば、保持ステップのためのpH値は、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5、または約10であってもよい。

20

【0170】

特定の実施形態では、保持ステップは、約12時間～約1週間にわたって、約6～7.5のpHで25℃で混合物をインキュベートすること、約5時間～約5日間にわたって、約4.5～5.9のpHで4℃で混合物をインキュベートすること、または約5時間～約1日間にわたって、約4.5～5.9のpHで25℃で混合物をインキュベートすることを含んでもよい。

【0171】

1ステッププロセスは、任意選択で、コンジュゲートの可溶性および回収を増加させるための反応ステップへのスクロースの添加を含んでもよい。望ましくは、約0.1%（w/v）～約20%（w/v）（例えば、約0.1%（w/v）、1%（w/v）、5%（w/v）、10%（w/v）、15%（w/v）、または20%（w/v））の濃度でスクロースを添加する。好ましくは、約1%（w/v）～約10%（w/v）（例えば、約0.5%（w/v）、約1%（w/v）、約1.5%（w/v）、約2%（w/v）、約3%（w/v）、約4%（w/v）、約5%（w/v）、約6%（w/v）、約7%（w/v）、約8%（w/v）、約9%（w/v）、約10%（w/v）、または約11%（w/v））の濃度でスクロースを添加する。さらに、反応ステップはまた、緩衝剤の添加をも含んでもよい。当業界で公知の任意の好適な緩衝剤を使用することができる。好適な緩衝剤としては、例えば、クエン酸バッファー、酢酸バッファー、コハク酸バッファー、およびリン酸バッファーが挙げられる。一実施形態では、緩衝剤は、HEPPSO（N-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-N'-（2-ヒドロキシプロパンスルホン酸））、POPSO（ピペラジン-1，4-ビス-（2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）無水物）、HEPES（4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-1-エタンスルホン酸）、HEPPS（EPPS）（4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-1-プロパンスルホン酸）、TES（N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-2-アミノエタンスルホン酸）、およびその組合せからなる群から選択される。

30

40

【0172】

一実施形態では、1ステッププロセスは、混合物を精製して、精製されたコンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4またはAb-CX1-1-

50

DM1)を提供するステップをさらに含んでもよい。当業界で公知の任意の精製方法を使用して、本発明のコンジュゲートを精製することができる。一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、接線流濾過(TFF)、非吸着クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、吸着濾過、選択的沈降、または任意の他の好適な精製プロセス、ならびにその組合せを使用する。別の態様では、コンジュゲートを上記の精製プロセスにかける前に、1または複数のPVDF膜を通してコンジュゲートを最初に濾過する。あるいは、コンジュゲートを上記の精製プロセスにかけた後に、1または複数のPVDF膜を通してコンジュゲートを濾過する。例えば、一実施形態では、コンジュゲートを1または複数のPVDF膜を通して濾過した後、接線流濾過を使用して精製する。あるいは、コンジュゲートを接線流濾過を使用して精製した後、1または複数のPVDF膜を通して濾過する。

10

【0173】

Pellicon(登録商標)型システム(Millipore、Billerica、MA)、Sartocan(登録商標)Cassetteシステム(Sartorius AG、Edgewood、NY)、およびCentrasette(商標)型システム(Pall Corp.、East Hills、NY)などの、任意の好適なTFFシステムを精製のために使用することができる。

【0174】

任意の好適な吸着クロマトグラフィー樹脂を、精製のために使用することができる。好ましい吸着クロマトグラフィー樹脂としては、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィー(HCIC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、イオン交換クロマトグラフィー、混合様式イオン交換クロマトグラフィー、固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)、染料リガンドクロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、およびその組合せが挙げられる。好適なヒドロキシアパタイト樹脂の例としては、セラミックヒドロキシアパタイト(CHT Type IおよびType II、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)、HA Ultrogel(登録商標)ヒドロキシアパタイト(Pall Corp.、East Hills、NY)、およびセラミックフルオロアパタイト(CFT Type IおよびType II、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適なHCIC樹脂の例は、MEP Hypercel(商標)樹脂(Pall Corp.、East Hills、NY)である。好適なHIC樹脂の例としては、Butyl-Sepharose(登録商標)、Hexyl-Sepharose(登録商標)、Phenyl-Sepharose(登録商標)、およびOctyl-Sepharose(登録商標)樹脂(全てGE Healthcare、Piscataway、NJから)、ならびにMacro-prepメチルおよびMacro-Prep-トブチル樹脂(Biorad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適なイオン交換樹脂の例としては、SP-Sepharose(登録商標)、CM-Sepharose(登録商標)、およびQ-Sepharose(登録商標)樹脂(全てGE Healthcare、Piscataway、NJから)、ならびにUnosphere(商標)S樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適な混合様式イオン交換体の例としては、Bakerbond(登録商標)ABx樹脂(JT Baker、Phillipsburg、NJ)が挙げられる。好適なIMAC樹脂の例としては、Chelating-Sepharose(登録商標)樹脂(GE Healthcare、Piscataway、NJ)およびProfinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適な染料リガンド樹脂の例としては、Blue-Sepharose(登録商標)樹脂(GE Healthcare、Piscataway、NJ)およびAffigel(登録商標)ブルー樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適な親和性樹脂の例としては、Protein A-Sepharose(登録商標)樹脂(例えば、MabSelect、GE Hea

20

30

40

50

lthcare、Piscataway、NJ）および抗体が適切なレクチン結合部位を担持する、レクチン親和性樹脂、例えば、Lentil Lectin Sepharose（登録商標）樹脂（GE Healthcare、Piscataway、NJ）が挙げられる。好適な逆相樹脂の例としては、C4、C8、およびC18樹脂（Grace Vydac、Hesperia、CA）が挙げられる。

【0175】

任意の好適な非吸着クロマトグラフィー樹脂を、精製のために使用することができる。好適な非吸着クロマトグラフィー樹脂の例としては、限定されるものではないが、SEPHADEX（商標）G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL（商標）樹脂（例えば、S-200およびS-300）、SUPERDEX（商標）樹脂（例えば、SUPERDEX（商標）75およびSUPERDEX（商標）200）、BIO-GEL（登録商標）樹脂（例えば、P-6、P-10、P-30、P-60、およびP-100）、ならびに当業者には公知の他のものが挙げられる。

【0176】

2ステッププロセスおよび1ポットプロセス

一実施形態では、本発明のコンジュゲートを、米国特許第7,811,572号および米国特許出願公開第2006/0182750号に記載のように調製することができる。このプロセスは、(a) 本発明の抗体を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させて、リンカー（すなわち、Ab-SMCC、Ab-SPDBまたはAb-CX1-1）を抗体に共有結合させることによって、リンカーが結合した抗体を含む第1の混合物を調製するステップ；(b) 任意選択で、第1の混合物を精製プロセスにかけて、リンカーが結合した抗体の精製された第1の混合物を調製するステップ；(c) 約4～約9のpHを有する溶液中で、リンカーが結合した抗体を薬物（例えば、DM1またはDM4）と反応させることにより、薬物（例えば、DM1またはDM4）を、第1の混合物中のリンカーが結合した抗体にコンジュゲートして、(i) コンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4またはAb-CX1-1-DM1）、(ii) 遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）；および(iii) 反応副生成物を含む第2の混合物を調製するステップ；ならびに(d) 第2の混合物を精製プロセスにかけて、第2の混合物の他の成分からコンジュゲートを精製するステップを含む。あるいは、精製ステップ(b)を省略してもよい。本明細書に記載の任意の精製方法を、ステップ(b)および(d)のために使用することができる。一実施形態では、TFPをステップ(b)と(d)の両方のために使用する。別の実施形態では、TFPをステップ(b)のために使用し、吸着クロマトグラフィー（例えば、CHT）をステップ(d)のために使用する。

【0177】

1ステップ試薬およびin situプロセス

一実施形態では、米国特許第6,441,163号および米国特許出願公開第2011/0003969号および第2008/0145374号に記載のように、予め形成された薬物-リンカー化合物（例えば、SMCC-DM1、スルホ-SMCC-DM1、SPDB-DM4またはCX1-1-DM1）を、本発明の抗体にコンジュゲートした後、精製ステップを行うことにより、本発明のコンジュゲートを調製することができる。本明細書に記載の任意の精製方法を使用することができる。薬物（例えば、DM1またはDM4）を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と反応させることにより、薬物-リンカー化合物を調製する。任意選択で、薬物-リンカー化合物（例えば、SMCC-DM1、スルホ-SMCC-DM1、SPDB-DM4またはCX1-1-DM1）を精製にかけた後、抗体にコンジュゲートする。

【0178】

4. 望ましい抗体および抗体薬物コンジュゲートの特性評価および選択

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または抗体薬物コンジュゲートを

、当業界で公知の様々なアッセイにより、その物理的／化学的特性および／または生物学的活性について特性評価し、選択することができる。

【0179】

例えば、本発明の抗体を、ELISA、FACS、Biacore（登録商標）またはウェスタンブロットなどの公知の方法により、その抗原結合活性について試験することができる。

【0180】

トランスジェニック動物および細胞系は、腫瘍関連抗原および細胞表面受容体のがん過剰発現の予防的または治療的処置としての潜在能力を有する抗体薬物コンジュゲート（ADC）をスクリーニングするのに特に有用である。有用なADCのスクリーニングは、トランスジェニック動物に、一定範囲の用量にわたって候補ADCを投与すること、および評価される疾患または障害に対するADCの効果（複数可）について、様々な時点でアッセイすることを含んでもよい。あるいは、またはさらに、該当する場合、疾患の誘導因子への曝露の前に、またはそれと同時に、薬物を投与することができる。候補ADCを、中効率または高効率スクリーニング形式の下で、連続的および個々に、または同時にスクリーニングすることができる。

【0181】

一実施形態は、（a）FGFR2またはFGFR4を発現する安定ながん細胞系またはヒト患者腫瘍（例えば、乳がん細胞系または腫瘍断片、胃がん細胞系または腫瘍断片）を、非ヒト動物に移植すること、（b）ADC薬物候補を非ヒト動物に投与すること、および（c）移植された細胞系からの腫瘍の成長を阻害する候補の能力を決定することを含むスクリーニング方法である。本発明はまた、（a）FGFR2またはFGFR4を発現する安定ながん細胞系に由来する細胞を、薬物候補と接触させること、および（b）安定な細胞系の成長を阻害するADC候補の能力を評価することを含む、FGFR2またはFGFR4の過剰発現を特徴とする疾患または障害の処置のためのADC候補をスクリーニングする方法も包含する。

【0182】

一実施形態は、（a）FGFR2またはFGFR4を発現する安定ながん細胞系に由来する細胞を、ADC薬物候補と接触させること、および（b）FGFR2またはFGFR4のリガンド活性化を遮断するADC候補の能力を評価することを含むスクリーニング方法である。別の実施形態では、リガンドにより刺激されたチロシンリン酸化を遮断するADC候補の能力を評価する。

【0183】

別の実施形態は、（a）FGFR2またはFGFR4を発現する安定ながん細胞系に由来する細胞を、ADC薬物候補と接触させること、および（b）細胞死を誘導するADC候補の能力を評価することを含むスクリーニング方法である。一実施形態では、アポトーシスを誘導するADC候補の能力を評価する。

【0184】

1つの実施形態では、候補ADCは、広範な用量にわたってトランスジェニック動物に投与されること、および経時的な化合物に対する動物の生理学的応答を評価することによりスクリーニングされる。いくつかの場合、化合物を、化合物の効能を増強するコファクターと共に投与することが適切であり得る。対象トランスジェニック動物から誘導される細胞系を使用して、FGFR2またはFGFR4の過剰発現と関連する様々な障害を処置するのに有用なADCについてスクリーニングする場合、適切な時間に試験ADCを細胞培養培地に添加し、ADCに対する細胞応答を、適切な生化学的および／または組織学的アッセイを使用して経時的に評価する。

【0185】

したがって、本発明は、FGFR2およびFGFR4の両方を特異的に標的として、それらに特異的に結合するADCを同定するためのアッセイを提供し、腫瘍細胞上でのそれらの過剰発現および増幅は、異常細胞機能に相関される。1つの実施形態では、本発明は

、下記属性：MCC-DM1またはSPDB-DM4へのコンジュゲーション後の10nM未満のヒトFGFR2に対する親和性、2nM未満のIC50を有するFGFR2/4で増幅され、および/またはFGFR2/4で過剰発現性の細胞の成長を阻害する能力、例えば単回3mg/kg IV投与後のマウスにおける45ml/d/kg未満のゆっくりとしたクリアランス速度を有する抗FGFR2/4抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を含むADCを提供する。

【0186】

FGFR2/4抗体

本発明は、ヒトFGFR2およびFGFR4（FGFR2/4）に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。本発明の抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）としては、実施例（以下のセクション6を参照）に記載するように単離されるヒトモノクローナル抗体またはそれらの断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0187】

ある特定の実施形態では、本発明は、FGFR2/4に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、配列番号7、27、47、67、87または107に記載のアミノ酸配列を有するVHドメインを含む、前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。ある特定の実施形態では、本発明はまた、FGFR2/4に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む、前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）も提供する。特定の実施形態では、本発明は、FGFR2/4に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVH CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3、4、5以上のVH CDRを含む（またはあるいは、からなる）前記抗体を提供する。

【0188】

本発明は、FGFR2/4に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、配列番号17、37、57、77、97または117のアミノ酸配列を有するVLドメインを含む前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。本発明はまた、FGFR2/4に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVL CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDRを含む、前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）も提供する。特に本発明は、FGFR2/4に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVL CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3以上のVL CDRを含む（またはあるいは、からなる）前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。

【0189】

本発明の他の抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、変異しているが、表1に記載の配列に記載のCDR領域と、CDR領域において少なくとも60、70、80、90または95パーセントの同一性を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、それは、表1に記載の配列に記載のCDR領域と比較した場合、1、2、3、4または5個以下のアミノ酸がCDR領域中で変異しているアミノ酸配列変異体を含む。

【0190】

本発明はまた、FGFR2/4に特異的に結合する抗体のVH、VL、完全長重鎖および完全長軽鎖をコードする核酸配列を提供する。かかる核酸配列は、哺乳動物細胞における発現に関して最適化され得る。

【0191】

【表 1】

表 1. 本発明の抗 FGFR2/4 抗体の例

(SEQ ID NO: 配列番号)

mAb 12425		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	DYAMS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	VIEGDGSYTHYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EKTYSSAFDY
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	EGDGSY
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (Chothia)	EKTYSSAFDY
SEQ ID NO: 7	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLE WVSVIEGDGSYTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREKTYSSAFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 8	DNA VH	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTCCGGCTTCACCTTTAGCG ACTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGG AATGGGTGTCAGTGATCGAGGGCGACGGTAGCTACACTCACTACG CCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGGGACAACCTCTAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACCTCACTGAGAGCCGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAAAGACCTACTCTAGCGCCTTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCACTCA
SEQ ID NO: 9	重鎖	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLE WVSVIEGDGSYTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREKTYSSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 10	DNA 重鎖	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTCCGGCTTCACCTTTAGCG ACTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGG

10

20

30

		AATGGGTGTCAGTGATCGAGGGCGACGGTAGCTACACTCACTACG CCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCCTACTATCTCTAGGGACAACCTCTAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGCCGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAAAGACCTACTCTAGCGCCTTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTATCAGCTAGCAC TAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACT TCCGGCGGAAGTGTGCTGCTGGGTGCTGCTGGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGG CGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTG TTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCGTGCTGACCGTGTGTCACCAAGGAGTGGTGAACGGCAAAG AATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGA AAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACC ACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTGACAGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCTGAGCCTGAGCCCCGCAAG
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	LCDR1	RASQDISSDLN
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	LCDR2	DASNLQS
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	LCDR3	QQHYSPSHT
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	LCDR1	SQDISSD
SEQ ID NO: 15 (Chothia)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 16 (Chothia)	LCDR3	HYSPPH
SEQ ID NO: 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISSDLNHWYQQKPGKAPKLLIY DASNLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYSPSHTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 18	DNA VL	GATATTGAGTACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCCTCAGTGG GCGATAGAGTACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGACATCTCTAG CGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCT GCTGATCTACGACGCTCTAACCTGCAGAGCGGCGTGCCTCTAGG

10

20

30

40

		TTTAGCGGTAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACCCTGACTATCTCTAG CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGCAGCACTAT AGCCCTAGTCACACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 19	輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISDLNWYQQKPGKAPKLLIY DASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYCQQHYSPTSF GQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 20:	DNA 輕鎖	GATATTGAGTACTGAGTACCTAGTACCTGAGCGCCTCAGTGG GCGATAGAGTACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGACATCTCTAG CGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCT GCTGATCTACGACGCTCTAACCTGCAGAGCGGCGTGCCCTCTAGG TTTAGCGGTAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACCCTGACTATCTCTAG CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGCAGCACTAT AGCCCTAGTCACACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGC GTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAA CTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
mAb 14629		
SEQ ID NO: 21	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 22	HCDR2 (Kabat)	YISPYMGETHYAQRFGQ
SEQ ID NO: 23	HCDR3 (Kabat)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 24	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 25	HCDR2 (Chothia)	SPYMGE
SEQ ID NO: 26	HCDR3 (Chothia)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 27	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGYISPYMGETHYAQRFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARESYEYFDIWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGC TCTAGCGTGAAGGTGCTGTAAAGCCTCCGGCGGCACCTTCTCTA GCTACGCTATTAGCTGGGTCCGACAGGCCCCAGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCTATATTAGCCCTATATGGGCGAGACTCACTACGC TCAGCGGTTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACT AGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCG CCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGTCTACGAGTACTTCGATATCTGG

10

20

30

40

SEQ ID NO: 29	重鎖	GGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGCATCA QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGYISPYMGETHYAQRFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAV YYCARESYEYFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 30	DNA 重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGC TCTAGCGTGAAGGTGCTCTGTAAAGCCTCCGGCGGCACCTTCTCTA GCTACGCTATTAGCTGGGTCCGACAGGCCCCAGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCTATATTAGCCCCTATATGGGCGAGACTCACTACGC TCAGCGGTTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACT AGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCG CCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGTCTACGAGTACTTCGATATCTGG GGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGCATCAGCTAGCACTAAGGGCC CAAGTGTGTTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGG AACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCC CAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCCTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG CCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCC TGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACCAACACCCCCC AGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG

10

20

30

40

SEQ ID NO: 31 (Kabat)	LCDR1	RASQSI SNDLA
SEQ ID NO: 32 (Kabat)	LCDR2	ATSILQS
SEQ ID NO: 33 (Kabat)	LCDR3	LQYYDYSYT
SEQ ID NO: 34 (Chothia)	LCDR1	SQSI SND
SEQ ID NO: 35 (Chothia)	LCDR2	ATS
SEQ ID NO: 36 (Chothia)	LCDR3	YYDYSY
SEQ ID NO: 37	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNDLAWYQQKPKAPKLLIY ATSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYYDYSYTFG QGTKVEIK
SEQ ID NO: 38	DNA VL	GATATT CAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCCTCAGTGG GCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCCAGTCTATCTCTAAC GACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGCTACCTCTATCCTGCAGAGCGGCGTGCCCTCTAGGTT TAGCGGTAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACCCTGACTATCTCTAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCTGCAGTACTACG ACTACTCCTACACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 39	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNDLAWYQQKPKAPKLLIY ATSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYYDYSYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 40	DNA 軽鎖	GATATT CAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCCTCAGTGG GCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCCAGTCTATCTCTAAC GACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACGCTACCTCTATCCTGCAGAGCGGCGTGCCCTCTAGGTT TAGCGGTAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACCCTGACTATCTCTAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCTGCAGTACTACG ACTACTCCTACACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCG TACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTCATCTCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAAC TTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
mAb 20562		
SEQ ID NO: 41	HCDR1 (Kabat)	DYAMS
SEQ ID NO: 42	HCDR2 (Kabat)	VIEGDASYTHYADSVRG
SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Kabat)	ERTYSSAFDY

10

20

30

40

SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Chothia)	EGDASY
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Chothia)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 47	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLE WVSVIEGDASYTHYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARERTYSSAFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 48	DNA VH	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCG ACTACGCTATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG AGTGGGTGAGCGTGATCGAGGGCGACGCTAGTTACACTCACTACG CCGATAGCGTCAGAGGCCGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCGGACCTACTCTAGCGCCTTC GACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 49	重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLE WVSVIEGDASYTHYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARERTYSSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKHTCTPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 50	DNA 重鎖	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCG ACTACGCTATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG AGTGGGTGAGCGTGATCGAGGGCGACGCTAGTTACACTCACTACG CCGATAGCGTCAGAGGCCGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCGGACCTACTCTAGCGCCTTC GACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGCGTAGCA CTAAGGGCCCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTAC TTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCAGCCCGTGACAGTGCTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCG GCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAG CCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCT GTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCC

10

20

30

40

		GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGA CCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAG CAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGAAG
SEQ ID NO: 51	LCDR1 (Kabat)	RASQDISSDLN
SEQ ID NO: 52	LCDR2 (Kabat)	DASNLQS
SEQ ID NO: 53	LCDR3 (Kabat)	QQHYSPSHT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Chothia)	SQDISSD
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Chothia)	HYSPSH
SEQ ID NO: 57	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSDLNWWYQQKPGKAPKLLIY DASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSPSHTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 58	DNA VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGG GCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGATATCTCTAG CGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTG CTGATCTACGACGCCTTAACCTGCAGTCAGGCGTGCCTCTAGGTT TAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGC CTGCAGCCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGCACTATA GCCCTAGTCACACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 59	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSDLNWWYQQKPGKAPKLLIY DASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSPSHTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 60	DNA 軽鎖	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGG GCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGATATCTCTAG CGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTG CTGATCTACGACGCCTTAACCTGCAGTCAGGCGTGCCTCTAGGTT TAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGC CTGCAGCCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGCACTATA

10

20

30

40

		GCCCTAGTCACACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAAC TTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCC CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
mAb 20811		
SEQ ID NO: 61	HCDR1 (Kabat)	DYAMS
SEQ ID NO: 62	HCDR2 (Kabat)	TIEGDSNYIEYADSVKG
SEQ ID NO: 63	HCDR3 (Kabat)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 64	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 65	HCDR2 (Chothia)	EGDSNY
SEQ ID NO: 66	HCDR3 (Chothia)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 67	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGL WVSTIEGDSNYIEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARERTYSSAFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 68	DNA VH	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGGGT GGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTACCTTTTCTG ACTACGCTATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCAAAGGTCTCGA GTGGGTTTCCACTATCGAAGGTGACAGCAACTACATCGAATATGCG GATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAA ACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAACGTACTTACTCTTCTGCTTTCGATT ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGA CTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 69	重鎖	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGL WVSTIEGDSNYIEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARERTYSSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 70	DNA 重鎖	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGGGT GGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTACCTTTTCTG ACTACGCTATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCAAAGGTCTCGA

10

20

30

40

		GTGGGTTTCCACTATCGAAGGTGACAGCAACTACATCGAATATGCG GATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAA ACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAACGTACTTACTCTTCTGCTTTGATT ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAA GGGTCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 71 (Kabat)	LCDR1	RASQDISSDLN
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR2	DASNLQS
SEQ ID NO: 73 (Kabat)	LCDR3	HQWYSTLYT
SEQ ID NO: 74 (Chothia)	LCDR1	SQDISSD
SEQ ID NO: 75 (Chothia)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 76 (Chothia)	LCDR3	WYSTLY
SEQ ID NO: 77	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSDLNHWYQQKPGKAPKLLIY DASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQWYSTLYTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 78	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCTT CTGACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TATTAATCTACGACGCTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCG

10

20

30

40

		CTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGC TCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCATCAGTGGTA CTCTACTCTGTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTTAA
SEQ ID NO: 79	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISDLNWWYQQKPKAPKLLIY DASNLQSGVPSRFSGSGSGDTFTLTISLQPEDFATYYCHQWYSTLYTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 80	DNA 軽鎖	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCTT CTGACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TATTAATCTACGACGCTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCG CTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGC TCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCATCAGTGGTA CTCTACTCTGTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTTAA CGTACGGTGCGCGCTCCAGCGTGTCATCTTCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGA GTGT
mAb 12422		
SEQ ID NO: 81	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 82	HCDR2 (Kabat)	YISPYMGETHYAQKFQG
SEQ ID NO: 83	HCDR3 (Kabat)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 84	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 85	HCDR2 (Chothia)	SPYMGE
SEQ ID NO: 86	HCDR3 (Chothia)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 87	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGYISPYMGETHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARESYEYFDIWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 88	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGC AGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCATCCGAGGGACGTTTAGC AGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTC GAGTGGATGGGCTACATCTCTCCGTACATGGGCGAAACTCATTACG CCCAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCGATGAAAGCAC CAGCACCGCTATATGGAAGTGCAGAGCTGCGCAGCGAAGATAC GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAATCTTACGAATACTTCGACATCT

10

20

30

40

		GGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 89	重鎖	QQQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLE WMGYISPYMGETHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAVY YCARESYEYFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEAL HNHYTQKSLSPGK
SEQ ID NO: 90	DNA 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGC AGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGC AGCTATGCGATTAGCTGGGTGCCAGGCCCGGGCCAGGGCCTC GAGTGATGGGCTACATCTCTCCGTACATGGGCGAACTCATTACG CCCAGAAATTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAAGCAC CAGCACCGCCTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC GGCCGTGTATTATTGCGCGCTGAATCTTACGAATACTTCGACATCT GGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGG GTCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCC CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT CCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC TGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACACGCTCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA

10

20

30

40

SEQ ID NO: 91 (Kabat)	LCDR1	RASQISNDLA
SEQ ID NO: 92 (Kabat)	LCDR2	ATSILQS
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	LCDR3	LQYYDYSYT
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	LCDR1	SQSISND
SEQ ID NO: 95 (Chothia)	LCDR2	ATS
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	LCDR3	YYDYSY
SEQ ID NO: 97	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNDLAWYQQKPGKAPKLLIY ATSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYYDYSYTFG QGTKVEIK
SEQ ID NO: 98	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTA ACGACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TATTAATCTACGCTACTTCTATCCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCTGACCATTAGCT CTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCTGCAGTACTAC GACTACTCTTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAC
SEQ ID NO: 99	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNDLAWYQQKPGKAPKLLIY ATSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYYDYSYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 100	DNA 軽鎖	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTA ACGACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TATTAATCTACGCTACTTCTATCCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCTGACCATTAGCT CTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCTGCAGTACTAC GACTACTCTTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAC GTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAA CTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCAACGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAG TGT
mAb 12439		
SEQ ID NO: 101	HCDR1 (Kabat)	SYDIS
SEQ ID NO: 102	HCDR2 (Kabat)	WINPYNGGTNYAQKFQG
SEQ ID NO: 103	HCDR3 (Kabat)	EGSGMIVYPGWSYAFDY

10

20

30

40

SEQ ID NO: 104	HCDR1 (Chothia)	GYTFTSY
SEQ ID NO: 105	HCDR2 (Chothia)	NPYNGG
SEQ ID NO: 106	HCDR3(Chothia)	EGSGMIVYPGWSYAFDY
SEQ ID NO: 107	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDISWVRQAPGQGLE WMGWINPYNGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSEDTA VYYCAREGSGMIVYPGWSYAFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 108	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAACCGGG TGCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTCCGGATATACCTTCACT TCTTACGACATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCG AGTGGATGGGCTGGATCAACCCGTACAACGGCGGTACGAACTACG CGCAGAAATTTAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCAT TAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCGTCTGCGTAGCGAAGATAC GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTTCTGGTATGATCGTTTAC CCGGGTTGGTCTTACGCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 109	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDISWVRQAPGQGLE WMGWINPYNGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSEDTA VYYCAREGSGMIVYPGWSYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSCKDTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 110	DNA 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAACCGGG TGCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTCCGGATATACCTTCACT TCTTACGACATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCG AGTGGATGGGCTGGATCAACCCGTACAACGGCGGTACGAACTACG CGCAGAAATTTAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCAT TAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCGTCTGCGTAGCGAAGATAC GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTTCTGGTATGATCGTTTAC CCGGGTTGGTCTTACGCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCTG GCACCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGG

10

20

30

40

		GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC CTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 111 (Kabat)	LCDR1	RASQDISNDLG
SEQ ID NO: 112 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 113 (Kabat)	LCDR3	QQHYHTPNT
SEQ ID NO: 114 (Chothia)	LCDR1	SQDISND
SEQ ID NO: 115 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 116 (Chothia)	LCDR3	HYHTPN
SEQ ID NO: 117	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNDLGWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYHTPNT FGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 118	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCTA ACGACCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TATTAATCTACGCTGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTAGCT CTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGCATTAC CATACTCCGAACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATAAA
SEQ ID NO: 119	輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNDLGWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYHTPNT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEHKVVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

SEQ ID NO: 120	DNA 軽鎖	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGACATTTCTA ACGACCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TATTAATCTACGCTGCTTCTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTAGCT CTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGCATTAC CATACTCCGAACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAC GTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAG TGT
----------------	--------	---

10

【0192】

本発明の他の抗体としては、アミノ酸またはアミノ酸をコードする核酸が変異しているが、表1に記載の配列に対する少なくとも60、70、80、90または95パーセントの同一性を有するものが挙げられる。いくつかの実施形態では、それは、表1に記載の配列に記載の可変領域と比較した場合、1、2、3、4または5個以下のアミノ酸が可変領域中で変異しているが、実質的に同じ治療活性を保持するアミノ酸配列変異体を含む。

20

【0193】

これらの抗体はそれぞれF G F R 2 / 4に結合することができるため、V H、V L、完全長軽鎖、および完全長重鎖配列（アミノ酸配列およびアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列）を「混合および一致」させて、本発明の他のF G F R 2 / 4結合抗体を作することができる。そのような「混合および一致」したF G F R 2 / 4結合抗体を、当業界で公知の結合アッセイ（例えば、E L I S A、および実施例のセクションに記載の他のアッセイ）を使用して試験することができる。これらの鎖を混合および一致させる場合、特定のV H / V L対に由来するV H配列を、構造的に類似するV H配列と置き換えるべきである。同様に、特定の完全長重鎖 / 完全長軽鎖対に由来する完全長重鎖配列を、構造的に類似する完全長重鎖配列と置き換えるべきである。同様に、特定のV H / V L対に由来するV L配列を、構造的に類似するV L配列と置き換えるべきである。同様に、特定の完全長重鎖 / 完全長軽鎖対に由来する完全長軽鎖配列を、構造的に類似する完全長軽鎖配列と置き換えるべきである。従って、一態様では、本発明は、抗体がF G F R 2 / 4に特異的に結合する、配列番号7、27、47、67、87および107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および配列番号17、37、57、77、97および117からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合領域を提供する。

30

40

【0194】

別の態様では、本発明は、（i）配列番号9、29、49、69、89および109からなる群から選択される哺乳動物細胞中での発現のために最適化されたアミノ酸配列を含む完全長重鎖；および配列番号19、39、59、79、99および119からなる群から選択される哺乳動物細胞中での発現のために最適化されたアミノ酸配列を含む完全長軽鎖を有する単離されたモノクローナル抗体；または（ii）その抗原結合ポーションを含む機能的タンパク質を提供する。

【0195】

別の態様では、本発明は、表1に記載の重鎖および軽鎖C D R 1、C D R 2およびC D

50

R 3、またはその組合せを含む F G F R 2 / 4 結合抗体を提供する。抗体の V H C D R 1 のアミノ酸配列を、配列番号 1、2 1、4 1、6 1、8 1 および 1 0 1 に示す。抗体の V H C D R 2 のアミノ酸配列を、配列番号 2、2 2、4 2、6 2、8 2 および 1 0 2 に示す。抗体の V H C D R 3 のアミノ酸配列を、配列番号 3、2 3、4 3、6 3、8 3 および 1 0 3 に示す。抗体の V L C D R 1 のアミノ酸配列を、配列番号 1 1、3 1、5 1、7 1、9 1 および 1 1 1 に示す。抗体の V L C D R 2 のアミノ酸配列を、配列番号 1 2、3 2、5 2、7 2、9 2 および 1 1 2 に示す。抗体の V L C D R 3 のアミノ酸配列を、配列番号 1 3、3 3、5 3、7 3、9 3 および 1 1 3 に示す。

【0196】

これらの抗体がそれぞれ F G F R 2 / 4 に結合することができ、抗原結合特異性が主に C D R 1、2 および 3 領域によって提供されることを考慮して、V H C D R 1、2 および 3 配列と、V L C D R 1、2 および 3 配列とを、「混合および一致」させることができる（すなわち、異なる抗体に由来する C D R を混合および一致させることができるが、それぞれの抗体は V H C D R 1、2 および 3 と、V L C D R 1、2 および 3 とを含有し、本発明の他の C 5 結合結合分子を作出しなければならない）。そのような「混合および一致」した F G F R 2 / 4 結合抗体を、当業界で公知の結合アッセイおよび実施例に記載のアッセイ（例えば、E L I S A）を使用して試験することができる。V H C D R 配列を混合および一致させる場合、特定の V H 配列に由来する C D R 1、C D R 2 および / または C D R 3 配列を、構造的に類似する C D R 配列（複数可）と置き換えるべきである。同様に、V L C D R 配列を混合および一致させる場合、特定の V L 配列に由来する C D R 1、C D R 2 および / または C D R 3 配列を、構造的に類似する C D R 配列（複数可）と置き換えるべきである。新規 V H および V L 配列を、1 または複数の V H および / または V L C D R 領域配列を、本開示のモノクローナル抗体について本明細書に示される C D R 配列に由来する構造的に類似する配列と置換することにより、新しい V H および V L 配列を作出することができることが当業者には容易に明らかである。

【0197】

従って、本発明は、抗体が F G F R 2 / 4 に特異的に結合する、配列番号 1、2 1、4 1、6 1、8 1 および 1 0 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1；配列番号 2、2 2、4 2、6 2、8 2 および 1 0 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2；配列番号 3、2 3、4 3、6 3、8 3 および 1 0 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3；配列番号 1 1、3 1、5 1、7 1、9 1 および 1 1 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1；配列番号 1 2、3 2、5 2、7 2、9 2 および 1 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2；ならびに配列番号 1 3、3 3、5 3、7 3、9 3 および 1 1 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合領域を提供する。

【0198】

特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 1 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 1 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【0199】

特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 2 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 2 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 3 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 3 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 3 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【0200】

特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 4 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 4 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 4 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 5 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 5 2 の軽鎖 C D R 2

、および配列番号 53 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【0201】

特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 61 の重鎖 C D R 1、配列番号 62 の重鎖 C D R 2、配列番号 63 の重鎖 C D R 3、配列番号 71 の軽鎖 C D R 1、配列番号 72 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 73 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【0202】

特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 81 の重鎖 C D R 1、配列番号 82 の重鎖 C D R 2、配列番号 83 の重鎖 C D R 3、配列番号 91 の軽鎖 C D R 1、配列番号 92 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 93 の軽鎖 C D R 3 を含む。

10

【0203】

特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 101 の重鎖 C D R 1、配列番号 102 の重鎖 C D R 2、配列番号 103 の重鎖 C D R 3、配列番号 111 の軽鎖 C D R 1、配列番号 112 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 113 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【0204】

ある特定の実施形態では、F G F R 2 / 4 に特異的に結合する抗体は、表 1 に記載される抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）である。

【0205】

20

1. エピトープおよび同エピトープに結合する抗体の同定

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 137 のアミノ酸 176 (L y s) および 210 (A r g) を含むヒト F G F R 2 上のエピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。幾つかの態様では、本発明は、配列番号 137 で示されるようなヒト F G F R 2 の位置 173 (A s n)、174 (T h r)、175 (V a l)、176 (L y s)、178 (A r g)、208 (L y s)、209 (V a l)、210 (A r g)、212 (G l n)、213 (H i s)、217 (I l e)、219 (G l u) にあるアミノ酸に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。

【0206】

30

1つの実施形態では、本発明は、ヒト F G F R 2 (p 21802-3 に従って番号付けられる、配列番号 137) のアミノ酸 160 ~ 189 (K M E K R L H A V P A A N T V K F R C P A G G N P M P T M R、配列番号 136) および／またはアミノ酸 198 ~ 216 (K M E K R L H A V P A A N T V K F R C、配列番号 141) のエピトープに結合する抗体および抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。

【0207】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 142 のアミノ酸 169 (L y s) および 203 (A r g) を含むヒト F G F R 4 上のエピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。幾つかの態様では、本発明は、配列番号 142 に示されるようなヒト F G F R 4 の位置 150 (T h r)、151 (H i s)、154 (A r g)、157 (L y s)、160 (H i s)、166 (A s n)、167 (T h r)、168 (V a l)、169 (L y s)、171 (A r g)、173 (P r o)、174 (A l a)、201 (A r g)、202 (L e u)、203 (A r g)、204 (H i s)、205 (G l n)、206 (H i s)、207 (T r p)、210 (V a l) および 212 (G l u) にあるアミノ酸に特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。

40

【0208】

1つの実施形態では、本発明は、ヒト F G F R 4 (P 22455-1 に従って番号付けられる、配列番号 142) のアミノ酸 150 ~ 174 (T H P Q R M E K K L H A V P A G N T V K F R C P A、配列番号 132) および／またはアミノ酸 201 ~ 212 (R L

50

RHQHWSLVME、配列番号133)のエピトープに結合する抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。

【0209】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号137のアミノ酸176(Lys)および210(Arg)を含むヒトFGFR2上のエピトープに、および配列番号142のアミノ酸169(Lys)および203(Arg)を含むヒトFGFR4上のエピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。

【0210】

1つの実施形態では、本発明は、ヒトFGFR2(p21802-3に従って番号付けられる、配列番号137)のアミノ酸160~189(KMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMP TMR、配列番号136)およびアミノ酸198~216(KMEKRLHAVPAANTVKFRCPA、配列番号141)のエピトープ、およびヒトFGFR4(P22455-1に従って番号付けられる、配列番号142)のアミノ酸150~174(THPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPA、配列番号132)およびアミノ酸201~212(RLRHQHWSLVME、配列番号133)のエピトープに結合する抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。

【0211】

本発明はまた、表1に記載する抗FGFR2/4抗体と同じエピトープに特異的に結合するか、または表1に記載する抗体と交差競合する抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。従って、さらなる抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を、FGFR2および/またはFGFR4結合アッセイにおいて本発明の他の抗体と交差競合する(例えば、統計的に有意な様式で、その結合を競合的に阻害する)その能力に基づいて同定することができる。FGFR2および/またはFGFR4タンパク質(例えば、ヒトFGFR2および/またはFGFR4)への本発明の抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)の結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がFGFR2および/またはFGFR4への結合について抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)と競合することができることを示す;そのような抗体は、非限定的理論によれば、それが競合する抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)と、FGFR2および/またはFGFR4タンパク質上の同じか、または関連する(例えば、構造的に類似するか、または空間的に近い)エピトープに結合することができる。特定の実施形態では、表1に記載する抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)と同じFGFR2および/またはFGFR4上のエピトープに結合する抗体は、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である。そのようなヒトまたはヒト化モノクローナル抗体を、本明細書に記載のように調製および単離することができる。

【0212】

2. Fc領域のフレームワークのさらなる変化

本発明のイムノコンジュゲートは、例えば、抗体の特性を改善するための、VHおよび/またはVL内のフレームワーク残基に対する改変をさらに含む改変された抗体またはその抗原結合性断片を含んでもよい。いくつかの実施形態では、フレームワーク改変を行って、抗体の免疫原性を低下させる。例えば、1つの手法は、1または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰変異」させることである。より特には、体細胞変異を受けた抗体は、抗体が誘導される生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有してもよい。抗体フレームワーク配列を、抗体が誘導される生殖系列配列と比較することにより、そのような残基を同定することができる。フレームワーク領域配列をその生殖系列構成に戻すために、例えば、部位特異的突然変異誘発により、体細胞変異を生殖系列配列に「復帰変異」させることができる。そのような「復帰変異」した抗体もまた、本発明により包含されることが意図される。

【0213】

別の型のフレームワーク改変は、フレームワーク領域内、またはさらには、1もしくは複数のCDR領域内の1または複数の残基を変異させて、T細胞エピトープを除去するこ

とによって、抗体の潜在的な免疫原性を低下させることを含む。この手法はまた、「脱免疫化」とも呼ばれ、Carr et al.による米国特許出願公開第20030153043号にさらに詳細に記載されている。

【0214】

フレームワークまたはCDR領域内で作製される改変に加えて、またはその代わりに、Fc領域内に改変を含む、典型的には、血清半減期、補体固定化、Fc受容体結合、および／または抗原依存的細胞性細胞毒性などの、抗体の1または複数の機能的特性を変化させるように、本発明の抗体を操作することができる。さらに、本発明の抗体を化学的に改変する（例えば、1もしくは複数の化学的部分を抗体に結合することができる）か、または改変してそのグリコシル化を変化させ、再度、抗体の1または複数の機能的特性を変化させることができる。これらの実施形態はそれぞれ、以下にさらに詳細に記載される。

10

【0215】

一実施形態では、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が増加する、例えば、増加するか、または減少するように、CH1のヒンジ領域を改変する。この手法は、Bodmer et al.による米国特許第5,677,425号にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変化させて、例えば、軽鎖および重鎖の集合を容易にするか、または抗体の安定性を増加もしくは減少させる。

【0216】

別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より特には、抗体が天然のFc-ヒンジドメインSpA結合と比較して弱いスタフィロコッカス（Staphylococcy1）タンパク質A（SpA）結合を有するように、1または複数のアミノ酸変異をFc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン境界領域中に導入する。この手法は、Ward et al.による米国特許第6,165,745号にさらに詳細に記載されている。

20

【0217】

さらに他の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸残基を、異なるアミノ酸残基と置き換えて、抗体のエフェクター機能を変化させることにより、Fc領域を変化させる。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対する変化した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、1または複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基と置き換えることができる。親和性を変化させるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であってもよい。この手法は、例えば、両方ともWinter et al.による米国特許第5,624,821号および第5,648,260号に記載されている。

30

【0218】

別の実施形態では、抗体が変化したC1q結合および／または低下した、もしくは無効化される補体依存的細胞毒性（CDC）を有するように、アミノ酸残基から選択される1または複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基と置き換えることができる。

【0219】

別の実施形態では、1または複数のアミノ酸残基を変化させることによって、補体を固定する抗体の能力を変化させる。この手法は、例えば、Bodmer et al.によるPCT公開第WO94/29351号に記載されている。特定の実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片の1または複数のアミノ酸を、1または複数のアロタイプアミノ酸残基により、図4に示すようにIgG1サブクラスおよびカッパアイソタイプに置き換える。アロタイプアミノ酸残基としては、限定されるものではないが、IgG1、IgG2およびIgG3サブクラスの重鎖の定常領域、ならびにJefferis et al., MAbs. 1:332-338 (2009)により記載されたようなカッパアイソタイプの軽鎖の定常領域も挙げられる。

40

【0220】

さらに別の実施形態では、Fc領域を改変して、抗体依存的細胞性細胞毒性（ADCC）を媒介する抗体の能力を増加させる、および／または1もしくは複数のアミノ酸を改変することによりFcγ受容体に対する抗体の親和性を増加させる。この手法は、例えば、PrestaによるPCT公開第WO00/42072号に記載されている。さらに、FcγR

50

I、FcγRII、FcγRIIIおよびFcRnに対するヒトIgG1上の結合部位がマッピングされており、結合が改善されたバリエーションが記載されている (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001を参照されたい)。

【0221】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化を改変する。例えば、無グリコシル化抗体を作製することができる (すなわち、抗体はグリコシル化を欠く)。グリコシル化を変化させて、例えば、「抗原」に対する抗体の親和性を増加させることができる。そのような炭水化物改変を、例えば、抗体配列内の1または複数のグリコシル化部位を変化させることにより達成することができる。例えば、1または複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらす1または複数のアミノ酸置換を作製することによって、その部位でのグリコシル化を除去することができる。そのような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。そのような手法は、例えば、Co et al. による米国特許第5,714,350号および第6,350,861号に記載されている。

10

【0222】

さらに、またはあるいは、フコシル残基の量が減少した低フコシル化抗体またはバイセクテイングGlcNac構造が増加した抗体などの、変化した型のグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが証明されている。そのような炭水化物改変を、例えば、グリコシル化機構が変化した宿主細胞中で抗体を発現させることにより達成することができる。グリコシル化機構が変化した細胞は当業界で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させることによって、グリコシル化が変化した抗体を生成する宿主細胞として使用することができる。例えば、Hang et al.によるEP1,176,195は、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が機能的に破壊された細胞系を記載し、そのような細胞系中で発現された抗体は低グリコシル化を示す。PrestaによるPCT公開第WO03/035835号は、フコースをAsn(297)に連結された炭水化物に結合させる能力が低下し、その宿主細胞中で発現される抗体の低フコシル化をもたらす、バリエーションCHO細胞系、Lec13細胞を記載している (Shields et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照されたい)。Umama et al.によるPCT公開第WO99/54342号は、操作された細胞系中で発現される抗体が、抗体のADCC活性の増加をもたらすバイセクテイングGlcNac構造の増加を示すように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ (例えば、ベータ(1,4)-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作された細胞系を記載している (Umana et al., Nat. Biotech. 17:176-180, 1999も参照されたい)。

20

30

【0223】

別の実施形態では、抗体をその生物学的半減期を増加させるように改変する。様々な手法が可能である。例えば、Wardの米国特許第6,277,375号に記載のような、1または複数の以下の変異を導入することができる: T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、Presta et al.による米国特許第5,869,046号および第6,121,022号に記載のように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから取られたサルベージ受容体結合エпитープを含有するように、抗体をCH1またはCL領域内で変化させることができる。

40

【0224】

3. FGFR2/4抗体の生成

限定されるものではないが、組換え発現、化学的合成、および抗体四量体の酵素的消化などの、当業界で公知の任意の手段によって抗FGFR2/4抗体およびその抗体断片 (例えば、抗原結合性断片) を生成することができるが、完全長モノクローナル抗体を、例えば、ハイブリドーマまたは組換え生成によって取得することができる。組換え発現は、当業界で公知の任意の適切な宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞などに由来するものであってよい。

50

【0225】

本発明は、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載のような重鎖もしくは軽鎖可変領域または相補性決定領域を含むセグメントをコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号8、28、48、68、88および108からなる群から選択されるポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号18、38、58、78、98および118からなる群から選択されるポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。

10

【0226】

いくつかの実施形態では、重鎖をコードするポリヌクレオチドは、配列番号10、30、50、70、90または110のポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、配列番号20、40、60、80、100または120のポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。

20

【0227】

本発明のポリヌクレオチドは、抗FGFR2/4抗体の可変領域配列のみをコードしてもよい。それらはまた、抗体の可変領域と定常領域との両方をコードしてもよい。いくつかのポリヌクレオチド配列は、例示的マウス抗FGFR2および/またはFGFR4抗体の1つの重鎖と軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードする。いくつかの他のポリヌクレオチドは、マウス抗体の1つの重鎖と軽鎖の可変領域とそれぞれ実質的に同一である2つのポリペプチドセグメントをコードする。

【0228】

ポリヌクレオチド配列を、抗FGFR2/4抗体またはその結合断片をコードする存在する配列（例えば、以下の実施例に記載の配列）のde novo固相DNA合成によるか、またはPCR突然変異誘発により生成することができる。Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979のホスホトリエステル法; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979のホスホジエステル法; Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981のジエチルホスホロアミダイト法; および米国特許第4,458,066号の固相支持体法などの、当業界で公知の方法により、核酸の直接化学合成を達成することができる。PCRによるポリヌクレオチド配列への変異の導入を、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; およびEckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991に記載のように実施することができる。

30

40

【0229】

また、上記の抗FGFR2/4抗体を生成するための発現ベクターおよび宿主細胞も、本発明において提供される。様々な発現ベクターを使用して、抗FGFR2/4抗体鎖または結合断片をコードするポリヌクレオチドを発現させることができる。ウイルスに基づく発現ベクターと非ウイルス発現ベクターの両方を使用して、哺乳動物宿主細胞中で抗体を生成することができる。非ウイルスベクターおよび系としては、典型的には、タンパク質またはRNAを発現させるための発現カセットを含む、プラスミド、エピソームベクター、およびヒト人工染色体（例えば、Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997を参照されたい）が挙げられる。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞中での抗FGFR2

50

／4ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現にとって有用な非ウイルスベクターとしては、pThioHis A、BおよびC、pcDNA（商標）3.1／His、pEBVHis A、BおよびC（Invitrogen、San Diego、CA）、MPSVベクター、ならびに他のタンパク質を発現させるための当業界で公知のいくつかの他のベクターが挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40に基づくベクター、パピローマウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルス、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林熱ウイルス（SFV）が挙げられる。Brent et al., supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; およびRosenfeld et al., Cell 68:143, 1992を参照されたい。

10

【0230】

発現ベクターの選択は、ベクターを発現させる意図される宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、抗FGFR2／4抗体鎖または断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーターおよび他の調節配列（例えば、エンハンサー）を含有する。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターを使用して、誘導条件下以外では挿入された配列の発現を防止する。誘導性プロモーターとしては、例えば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーターまたは熱ショックプロモーターが挙げられる。形質転換された生物の培養物を、発現生成物が宿主細胞によってより良好に許容されるコード配列について集団を偏らせることなく、非誘導条件下で拡張することができる。プロモーターに加えて、他の調節エレメントも、抗FGFR2／4抗体鎖または断片の効率的発現にとって必要とされるか、または望まれる。これらのエレメントは、典型的には、ATG開始コドンおよび隣接するリボソーム結合部位または他の配列を含む。さらに、発現の効率を、使用において細胞系にとって適切なエンハンサーの含有により増強することができる（例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; およびBittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987を参照されたい）。例えば、SV40エンハンサーまたはCMVエンハンサーを使用して、哺乳動物宿主細胞中での発現を増加させることができる。

20

【0231】

発現ベクターはまた、挿入される抗FGFR2／4抗体配列によりコードされるポリペプチドとの融合タンパク質を形成するための分泌シグナル配列位置も提供することができる。より頻繁には、挿入される抗FGFR2／4抗体配列を、ベクター中に含有させる前にシグナル配列に連結する。抗FGFR2／4抗体軽鎖および重鎖可変ドメインをコードする配列を受容するために使用されるベクターは、その定常領域または部分もコードすることがある。そのようなベクターにより、定常領域との融合タンパク質としての可変領域の発現が可能になり、それにより、インタクト抗体またはその断片の生成がもたらされる。典型的には、そのような定常領域はヒトである。

30

【0232】

抗FGFR2／4抗体鎖を担持および発現させるための宿主細胞は、原核または真核であってもよい。大腸菌（E.coli）は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングし、発現させるのに有用な1つの原核宿主である。使用にとって好適な他の微生物宿主としては、バチルス・サブチリス（Bacillus subtilis）などの桿菌、ならびにサルモネラ（Salmonella）、セラチア（Serratia）、および様々なシュードモナス（Pseudomonas）種などの他の腸内細菌科が挙げられる。これらの原核宿主においては、当業者であれば、典型的には宿主細胞と適合する発現制御配列（例えば、複製起点）を含有する発現ベクターを作製することもできる。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ペーターラクタマーゼプロモーター系、またはラムダファージに由来するプロモーター系などの、任意数の様々な周知のプロモーターが存在する。プロモーターは、典型的には、任意選択でオペレーター配列と共に発現を制御し、転写および翻訳を開始および完了させるためのリボソーム結合部位配列などを有する。酵母などの他の微生物を使用して、本発明の抗FGFR2／4ポリペプチドを発現させることもできる。バキュロウイ

40

50

ルスベクターと組み合わせた昆虫細胞を使用することもできる。

【0233】

いくつかの好ましい実施形態では、哺乳動物宿主細胞を使用して、本発明の抗F G F R 2 / 4 ポリペプチドを発現および生成させる。例えば、それらは、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現するハイブリドーマ細胞系（例えば、実施例に記載のミエローマハイブリドーマクローン）または外因性発現ベクターを担持する哺乳動物細胞系（例えば、以下に例示されるS P 2 / 0 ミエローマ細胞）であってもよい。これらのものは、任意の正常な死滅する、または正常もしくは異常な不死の動物もしくはヒト細胞を含む。例えば、C H O 細胞系、様々なC o s 細胞系、H e L a 細胞、ミエローマ細胞系、形質転換されたB細胞およびハイブリドーマなどの、インタクト免疫グロブリンを分泌することができるいくつかの好適な宿主細胞系が開発されている。ポリペプチドを発現させるための哺乳動物組織細胞培養の使用は、例えば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987で一般的に考察されている。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、およびエンハンサーなどの発現制御配列（例えば、Queen et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986を参照されたい）、ならびにリボソーム結合部位、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報部位を含んでもよい。これらの発現ベクターは通常、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスから誘導されるプロモーターを含有する。好適なプロモーターは、構成的である、細胞型特異的である、段階特異的である、および／またはモジュレート可能もしくは調節可能であってもよい。有用なプロモーターとしては、限定されるものではないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性M M T V プロモーター、S V 4 0 プロモーター、M R P p o l I I I プロモーター、構成的M P S V プロモーター、テトラサイクリン誘導性C M V プロモーター（ヒト極初期C M V プロモーターなど）、構成的C M V プロモーター、および当業界で公知のプロモーター-エンハンサーの組合せが挙げられる。

【0234】

対象のポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入するための方法は、細胞宿主の型に応じて変化する。例えば、原核細胞のためには塩化カルシウムトランスフェクションが一般的に使用されるが、他の細胞宿主のためにはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションを使用してもよい（一般的には、Sambrook et al., supraを参照されたい）。他の方法としては、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リボソーム媒介性形質転換、インジェクションおよびマイクロインジェクション、弾道法、ビロソーム、イムノリボソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイキッドD N A、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質V P 2 2 との融合（Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997）、D N A の薬剤増強性取込み、およびe x v i v oでの形質導入が挙げられる。組換えタンパク質の長期的な、高収率の生成のためには、安定な発現が望ましいことが多い。例えば、抗F G F R 2 および／またはF G F R 4 抗体鎖または結合断片を安定に発現する細胞系を、ウイルスの複製起点または内因性発現エレメントと、選択マーカー遺伝子とを含有する本発明の発現ベクターを使用して調製することができる。ベクターの導入後、細胞を富化培地中で1～2日間成長させた後、選択培地に切替えることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在により、選択培地中で導入された配列を上手く発現する細胞の成長が可能となる。耐性の安定にトランスフェクトされた細胞を、細胞型にとって適切な組織培養技術を使用して増殖させることができる。

【0235】

治療的および診断的使用

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートは、限定されるものではないが、固形がんなどのがんの処置などの様々な適用において有用である。ある特定の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートは、腫瘍成長の阻害、分化の誘導、腫瘍体積の減少、

および／または腫瘍の発がん性の低下にとって有用である。使用方法は、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*での方法であってもよい。

【0236】

一態様では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートは、生物試料中のFGFR2またはFGFR4の存在を検出するのに有用である。本明細書で使用される用語「検出すること」は、定量的または定性的検出を包含する。ある特定の実施形態では、生物試料は細胞または組織を含む。ある特定の実施形態では、そのような組織は、他の組織と比較してより高いレベルでFGFR2またはFGFR4を発現する正常および／またはがん性組織を含む。

【0237】

一態様では、本発明は、生物試料中のFGFR2またはFGFR4の存在を検出する方法を提供する。ある特定の実施形態では、この方法は、抗体の抗原への結合を可能にする条件下で、生物試料を抗FGFR2／4抗体と接触させること、および抗体と抗原との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。

【0238】

1つの態様では、本発明は、FGFR2またはFGFR4の増加された発現に関連付けられる障害を診断する方法を提供する。ある特定の実施形態では、この方法は、試験細胞を抗FGFR2／4抗体と接触させること；抗FGFR2／4抗体のFGFR2またはFGFR4抗原への結合を検出することにより試験細胞上でのFGFR2またはFGFR4の発現レベルを決定すること（定量的または定性的に）；および試験細胞中でのFGFR2またはFGFR4の発現レベルを、対照細胞（例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞またはそのような正常細胞と同等のレベルでFGFR2またはFGFR4を発現する細胞）中でのFGFR2またはFGFR4の発現レベルと比較することを含み、対照細胞と比較して、試験細胞上でのFGFR2またはFGFR4の発現レベルが高い場合、FGFR2またはFGFR4の発現の増加と関連する障害の存在を示す。ある特定の実施形態では、試験細胞は、FGFR2またはFGFR4の発現の増加と関連する障害を有することが疑われる個体から得られる。ある特定の実施形態では、障害は、がんまたは腫瘍などの細胞増殖性障害である。ある特定の実施形態では、上記方法は、試験細胞においてFGFR2遺伝子のコピー数を測定することを含む。ある特定の実施形態では、上記方法は、PAX-FOXOトランスロケーション突然変異を検出することを含む。遺伝子のコピー数および／またはトランスロケーション突然変異は、当技術分野で公知の標準的な方法、例えばPCR、RT-PCR等を使用して検出することができる。

【0239】

ある特定の実施形態では、上記のものなどの診断または検出の方法は、細胞表面上で、または表面上にFGFR2またはFGFR4を発現する細胞から得られる膜調製物中で発現されるFGFR2またはFGFR4への抗FGFR2／4抗体の結合を検出することを含む。細胞表面上に発現されるFGFR2またはFGFR4への抗FGFR2／4抗体の結合を検出するための例示的アッセイは、「FACS」アッセイである。

【0240】

ある特定の他の方法を使用して、FGFR2またはFGFR4への抗FGFR2／4抗体の結合を検出することができる。そのような方法としては、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、および免疫組織化学（IHC）などの、当業界で周知である抗原結合アッセイが挙げられる。

【0241】

ある特定の実施形態では、抗FGFR2／4抗体を標識する。標識としては、限定されるものではないが、直接検出される標識または部分（蛍光、発色、高電子密度、化学発光、および放射性標識など）、ならびに例えば、酵素反応または分子相互作用を介して間接的に検出される、酵素またはリガンドなどの部分が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0242】

ある特定の実施形態では、抗F G F R 2 / 4抗体を、不溶性マトリックス上に固定する。固定は、溶液中で遊離したままである任意のF G F R 2またはF G F R 4タンパク質から抗F G F R 2 / 4抗体を分離することを必要とする。これは、水に不溶性のマトリックスもしくは表面への吸着（Bennich et al, 米国特許第3, 720, 760号）により、もしくは共有カップリング（例えば、グルタルアルデヒド架橋を使用する）により、アクセス手順の前に抗F G F R 2 / 4抗体を不溶化することによって、または例えば、免疫沈降により、抗F G F R 2 / 4抗体とF G F R 2またはF G F R 4タンパク質との複合体の形成後に抗c K I T抗体を不溶化することによって、都合良く達成される。

【0243】

診断または検出の上記実施形態のいずれかを、抗F G F R 2 / 4抗体の代わりに、またはそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを使用して実行することができる。

【0244】

一実施形態では、本発明は、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを患者に投与することを含む、疾患を処置、または防止する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートを使用して処置される疾患は、がんである。処置および／または防止され得る疾患の例としては、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫／ラブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、胃がん、頭部および頸部がん、肝細胞がん、カボジ肉腫、肝臓がん、非小細胞肺がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小細胞肺がん、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、扁平上皮頸部がん、胃がん、子宮がん、膣がん、外陰がんが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、がんは、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）および抗体薬物コンジュゲートが結合するF G F R 2またはF G F R 4発現性細胞を特徴とする。ある特定の実施形態では、がんは、F G F R 2またはF G F R 4のD N Aコピー数の増加を特徴とする。ある特定の実施形態では、がんは、例えば、それぞれ、F G F R 2またはF G F R 4 R N Aの増加により測定されるように、F G F R 2またはF G F R 4の発現の増加を特徴とする。本発明は、治療有効量の本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む、がんを処置する方法を提供する。ある特定の実施形態では、がんは固形がんである。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、がんは、耐性がんおよび／または再発したがんである。ある特定の態様では、例えば、耐性がんは、E G F R阻害剤、H e r 2阻害剤、H e r 3阻害剤、I G F R阻害剤およびM e t阻害剤を含むがこれらに限定されないチロシンキナーゼ阻害剤に耐性である。ある特定の実施形態では、がんは、H e r 2耐性がんである。

【0245】

ある特定の実施形態では、本発明は、対象に、治療有効量の本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む、腫瘍成長を阻害する方法を提供する。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は、腫瘍を有するか、または腫瘍が除去されている。ある特定の実施形態では、腫瘍は、E G F R阻害剤、H e r 2阻害剤、H e r 3阻害剤、I G F R阻害剤およびM e t阻害剤を含むがこれらに限定されない他のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性である。

【0246】

ある特定の実施形態では、腫瘍は、抗F G F R 2 / 4抗体が結合するF G F R 2またはF G F R 4を発現する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、ヒトF G F R 2またはF G F R 4を過剰発現する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、F G F R 2遺伝子のコピー数の増加を有する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、F G F R 4の過剰発現を引き起こすP A X - F O X Oトランスロケーション突然変異を有する。

【0247】

本発明はまた、治療有効量の上記抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートによる処置に関して患者を選択する方法を提供する。ある特定の態様では、上記方法は、チロシンキナーゼ阻害剤耐性がんを有する患者を選択することを含む。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤耐性がんが、E G F R 阻害剤、H e r 2 阻害剤、H e r 3 阻害剤、I G F R 阻害剤および／またはM e t 阻害剤に耐性であると意図される。ある特定の態様では、耐性がんは、H e r 2 耐性がんであると意図される。より具体的には、H e r 2 耐性がんは、トラスツズマブまたはトラスツズマブエムタンシンに応答しないと意図される。ある特定の態様では、がんは、新生耐性がんであると意図され、さらに他の態様では、がんは、再発したがん、例えばH e r 2 再発がんであると意図される。本発明のある特定の態様では、上記方法は、新生耐性または再発したがんを有する患者を選択すること、およびF G F R 2 および／またはF G F R 4 の発現に関して測定することを含む。ある特定の態様では、再発したがんまたは腫瘍が、初期ではF G F R 2 またはF G F R 4 発現性がんまたは腫瘍ではなかったが、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、トラスツズマブまたはトラスツズマブエムタンシン）による処置後に、チロシンキナーゼ耐性の、もしくは再発したがんまたは腫瘍であるF G F R 2 および／またはF G F R 4 陽性がんとなることが意図される。

【0248】

疾患の処置のために、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートの適切な用量は、処置しようとする疾患の種類、疾患の重症度および経過、疾患の応答性、以前の療法、患者の病歴などの様々な因子に依存する。抗体または薬剤を1回で、または数日から数カ月継続する一連の処置にわたって、または治療が行われるか、もしくは疾患状態の縮小（例えば、腫瘍サイズの減少）が達成されるまで投与することができる。最適な投薬スケジュールは、患者の体内での薬物蓄積の測定値から算出することができ、個々の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートの相対的効力に応じて変化する。ある特定の実施形態では、用量は0.01mg〜10mg（例えば、0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、7mg、8mg、9mg、または10mg）／kg体重であり、1日、1週間、1カ月または1年に1回またはそれ以上投与することができる。ある特定の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートは、2週間毎に1回または3週間毎に1回投与される。処置する医師であれば、体液または組織中での測定された滞留時間および薬物濃度に基づいて、投与のための反復速度を推定することができる。

【0249】

組合せ療法

ある特定の例では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを、他の抗がん剤、抗アレルギー剤、抗嘔吐剤（または制吐剤）、疼痛緩和剤、細胞保護剤、およびその組合せなどの他の治療剤と組み合わせる。

【0250】

組合せ療法における使用のために考えられる一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール（A r i m i d e x（登録商標））、ビカルタミド（C a s o d e x（登録商標））、硫酸ブレオマイシン（B l e n o x a n e（登録商標））、ブスルファン（M y l e r a n（登録商標））、ブスルファン注射液（B u s u l f e x（登録商標））、カペシタビン（X e l o d a（登録商標））、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン（P a r a p l a t i n（登録商標））、カルムスチン（B i C N U（登録商標））、クロラムブシル（L e u k e r a n（登録商標））、シスプラチン（P l a t i n o l（登録商標））、クラドリビン（L e u s t a t i n（登録商標））、シクロホスファミド（C y t o x a n（登録商標）またはN e o s a r（登録商標））、シタラビン、シトシンアラビノシド（C y t o s a r - U（登録商標））、シタラビンリポソーム注射液（D e p o C y t（登録商標））、ダカルバジン（D T I

C-Dome（登録商標））、ダクチノマイシン（Actinomycin D、Cosmegan）、塩酸ダウノルビシン（Cerubidine（登録商標））、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射液（DaunoXome（登録商標））、デキサメタゾン、ドセタキセル（Taxotere（登録商標））、塩酸ドキソルビシン（Adriamycin（登録商標））、Rubex（登録商標）、エトポシド（Vepesid（登録商標））、リン酸フルダラビン（Fludara（登録商標））、5-フルオロウラシル（Adrucil（登録商標））、Efudex（登録商標）、フルタミド（Eulexin（登録商標））、テザシチビン、ゲムシタビン（ジフルオロデオキシシチジン）、ヒドロキシウレア（Hydrea（登録商標））、イダルビシン（Idamycin（登録商標））、イフォスファミド（IFEX（登録商標））、イリノテカン（Campthosar（登録商標））、L-アスパラギナーゼ（ELSPAR（登録商標））、ロイコボリンカルシウム、メルファラン（Alkeran（登録商標））、6-メルカプトプリン（Purinethol（登録商標））、メトトレキサート（Folex（登録商標））、ミトキサントロン（Novantrene（登録商標））、マイロタッグ、パクリタキセル（Taxol（登録商標））、フェニックス（イットリウム90/MX-DTPA）、ペントスタチン、カルムスチンインプラントを含むポリフェプロサン20（Gliadel（登録商標））、クエン酸タモキシフェン（Nolvadex（登録商標））、テニポシド（Vumon（登録商標））、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン（Tirazone（登録商標））、注射用塩酸トポテカン（Hycamptin（登録商標））、ビンブラスチン（Velban（登録商標））、ビンクリスチン（Oncovin（登録商標））、およびビノレルビン（Navelbine（登録商標））が挙げられる。

10

20

【0251】

一実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを、抗がん特性を有する第2の化合物との組合せ療法として組合せ医薬製剤、または用量レジメン中で組み合わせる。組合せ医薬製剤または用量レジメンの第2の化合物は、それらが互いに有害に作用しないような、抗体または組合せのイムノコンジュゲートに対する相補的活性を有してもよい。例えば、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートは、化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤、FGF下流シグナル伝達経路阻害剤、IAP阻害剤、Bcl2阻害剤、Mcl1阻害剤、および他のFGFR2阻害剤と組み合わせ投与され得るが、これらに限定されない。

30

【0252】

本明細書で使用される用語「組合せ医薬(pharmaceutical combination)」とは、1つの単位剤形中の固定的組合せ、または2つ以上の治療剤を同時に独立に、もしくは特に、組合せパートナーが協調的な、例えば、相乗効果を示すことができる時間間隔内で別々に投与することができる非固定的組合せもしくは組み合わせ投与のための部分のキットを指す。

【0253】

用語「組合せ療法」とは、本開示に記載の治療状態または障害を処置するための2つ以上の治療剤の投与を指す。そのような投与は、固定比の活性成分を有する単一のカプセルなどの、実質的に同時的な様式でのこれらの治療剤の同時投与を包含する。あるいは、そのような投与は、それぞれの活性成分について、複数の、または別々の容器（例えば、カプセル、粉末、および液体）中での同時投与を包含する。粉末および／または液体を、投与前に所望の用量に再構成または希釈することができる。さらに、そのような投与はまた、ほぼ同時に、または異なる時間に、連続的様式でのそれぞれの種類の治療剤の使用も包含する。いずれかの場合、処置レジメンは、本明細書に記載の状態または障害の処置において組合せ薬物の有益な効果を提供する。

40

【0254】

組合せ療法は、「相乗作用」を提供し、「相乗的」であることがわかってよい、すなわち、活性成分と一緒に使用した場合に達成される効果は、化合物を別々に使用すること

50

から得られる効果の合計よりも大きい。活性成分が（１）組み合わせた単位用量製剤中で同時製剤化および投与されるか、もしくは同時に送達される；（２）別々の製剤として交互に、もしくは同時に送達される；または（３）いくつかの他のレジメンによるものである場合、相乗効果を達成することができる。交互療法において送達される場合、化合物が例えば、別々の注射筒中の異なる注射液により連続的に投与または送達される場合、相乗効果を達成することができる。一般に、交互療法中では、有効用量の各活性成分は連続的に、すなわち、順次投与されるが、組合せ療法においては、有効用量の２つ以上の活性成分は一緒に投与される。

【０２５５】

一態様では、本発明は、限定されるものではないが、EGFR阻害剤、Her2阻害剤、Her3阻害剤、IGFR阻害剤、およびMet阻害剤などの１または複数のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することにより、がんを処置する方法を提供する。

【０２５６】

例えば、チロシンキナーゼ阻害剤としては、限定されるものではないが、塩酸エルロチニブ（Tarceva（登録商標））；リニファニブ（Genentechから入手可能なABT869としても知られる、N-[4-(3-アミノ-1H-インダゾール-4-イル)フェニル]-N'-(2-フルオロ-5-メチルフェニル)ウレア）；リンゴ酸スニチニブ（Sutent（登録商標））；ボスチニブ（SKI-606としても知られ、米国特許第6,780,996号に記載された、4-[(2,4-ジクロロ-5-メトキシフェニル)アミノ]-6-メトキシ-7-[3-(4-メチルピペラジン-1-イル)プロポキシ]キノリン-3-カルボニトリル）；ダサチニブ（Sprycel（登録商標））；パゾパニブ（Votrient（登録商標））；ソラフェニブ（Nexavar（登録商標））；ザクチマ（ZD6474）；およびイマチニブまたはメシル酸イマチニブ（Gilevec（登録商標）およびGleevec（登録商標））が挙げられる。

【０２５７】

上皮成長因子受容体（EGFR）阻害剤としては、限定されるものではないが、塩酸エルロチニブ（Tarceva（登録商標））、ゲフィチニブ（Iressa（登録商標））；N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[[[3',3']-テトラヒドロ-3-フラニル]オキシ]-6-キナゾリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブテナミド、Tovok（登録商標））；バンデタニブ（Caprelsa（登録商標））；ラパチニブ（Tykerb（登録商標））；(3R,4R)-4-アミノ-1-((4-((3-メトキシフェニル)アミノ)ピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)メチル)ピペリジン-3-オール（BMS690514）；カネルチニブ二塩酸塩（CI-1033）；6-[4-[(4-エチル-1-ピペラジニル)メチル]フェニル]-N-[(1R)-1-フェニルエチル]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン（AEE788、CAS497839-62-0）；ムブリチニブ（TAK165）；ペリチニブ（EKB569）；アフアチニブ（BI2992）；ネラチニブ（HKI-272）；N-[4-[[1-[(3-フルオロフェニル)メチル]-1H-インダゾール-5-イル]アミノ]-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イル]-カルバミン酸、(3S)-3-モルホリニルメチルエステル（BMS599626）；N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[[3α,5β,6α]-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c]ピロール-5-イル]メトキシ]-4-キナゾリナミン（XL647、CAS781613-23-8）；および4-[4-[[[1R)-1-フェニルエチル]アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-yl]-フェノール（PKI166、CAS187724-61-4）が挙げられる。

【０２５８】

EGFR抗体としては、限定されるものではないが、セツキシマブ（Erbix（登録商標））；パニツムマブ（Vectibix（登録商標））；マツズマブ（EMD-

10

20

30

40

50

72000) ; トラスツズマブ (Herceptin (登録商標)) ; ニモツズマブ (hR3) ; ザルツムマブ ; TheraCIM h-R3 ; MDX0447 (CAS339151-96-1) ; および ch806 (mAb-806、CAS946414-09-1) が挙げられる。

【0259】

ヒト上皮成長因子受容体2 (Her2受容体) (Neu、ErbB-2、CD340、またはp185としても知られる) 阻害剤としては、限定されるものではないが、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標)) ; ペルツズマブ (Omni targ (登録商標)) ; トラスツズマブエムタンシン (Kadcyla (登録商標)) ; ネラチニブ (HKI-272、(2E)-N-[4-[[3-クロロ-4-[(ピリジン-2-イル) メトキシ] フェニル] アミノ] -3-シアノ-7-エトキシキノリン-6-イル] -4-(ジメチルアミノ) ブター-2-エンアミド、PCT公開第WO05/028443号に記載) ; ラパチニブまたはラパチニブジトシレート (ditosylate) (Tykerb (登録商標)) ; (3R, 4R)-4-アミノ-1-((4-((3-メトキシフェニル) アミノ) ピロロ[2, 1-f][1, 2, 4] トリアジン-5-イル) メチル) ピペリジン-3-オール (BMS690514) ; (2E)-N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル) アミノ] -7-[[(3S)-テトラヒドロ-3-フラニル] オキシ] -6-キナゾリニル] -4-(ジメチルアミノ)-2-ブテナミド (BI BW-2992、CAS850140-72-6) ; N-[4-[[1-[(3-フルオロフェニル) メチル] -1H-インダゾール-5-イル] アミノ] -5-メチルピロロ[2, 1-f][1, 2, 4] トリアジン-6-イル] -カルバミン酸、(3S)-3-モルホリニルメチルエステル (BMS599626、CAS714971-09-02) ; カネルチニブ二塩酸塩 (PD183805またはCI-1033) ; および N-(3, 4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[(3α, 5β, 6α)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c] ピロール-5-イル] メトキシ] -4-キナゾリナミン (XL647、CAS781613-23-8) が挙げられる。

【0260】

Her3阻害剤としては、限定されるものではないが、LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111、およびMEHD-7945Aが挙げられる。

【0261】

MET阻害剤としては、限定されるものではないが、カボザンチニブ (XL184、CAS849217-68-1) ; フォレチニブ (GSK1363089、以前はXL880、CAS849217-64-7) ; チバンチニブ (ARQ197、CAS1000873-98-2) ; 1-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-N-(5-(7-メトキシキノリン-4-イルオキシ)ピリジン-2-イル)-5-メチル-3-オキソ-2-フェニル-2, 3-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド (AMG458) ; クリゾチニブ (Xalkori (登録商標)、PF-02341066) ; (3Z)-5-(2, 3-ジヒドロ-1H-インドール-1-イルスルホニル)-3-({3, 5-ジメチル-4-[(4-メチルピペラジン-1-イル) カルボニル] -1H-ピロール-2-イル} メチレン)-1, 3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン (SU11271) ; (3Z)-N-(3-クロロフェニル)-3-({3, 5-ジメチル-4-[(4-メチルピペラジン-1-yl) カルボニル] -1H-ピロール-2-イル} メチレン)-N-メチル-2-オキソインドリン-5-スルホンアミド (SU11274) ; (3Z)-N-(3-クロロフェニル)-3-{{[3, 5-ジメチル-4-(3-モルホリン-4-イルプロピル)-1H-ピロール-2-イル] メチレン}-N-メチル-2-オキソインドリン-5-スルホンアミド (SU11606) ; 6-[ジフルオロ[6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1, 2, 4-トリアゾロ[4, 3-b]ピリダジン-3-イル] メチル]-キノリン (JNJ38877605、CAS943540-75-8) ; 2-[4-[1-(キノリン-6-イルメチル)-1H-[1, 2, 3]ト

10

20

30

40

50

リアゾロ [4, 5-b] ピラジン-6-イル] -1H-ピラゾール-1-イル] エタノール (PF04217903、CAS 956905-27-4); N-((2R)-1, 4-ジオキサ-2-イルメチル)-N-メチル-N'-[3-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-5-オキソ-5H-ベンゾ [4, 5] シクロヘプタ [1, 2-b] ピリジン-7-イル] スルファミド (MK2461、CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1, 2, 4-トリアゾロ [4, 3-b] ピリダジン-3-イル] チオ] -キノリン (SGX523、CAS 1022150-57-7); および (3Z)-5-[[(2, 6-ジクロロフェニル) メチル] スルホニル] -3-[[3, 5-ジメチル-4-[[(2R)-2-(1-ピロリジニルメチル)-1-ピロリジニル] カルボニル] -1H-ピロール-2-イル] メチレン] -1, 3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン (PHA665752、CAS 477575-56-7) が挙げられる。

10

【0262】

IGF1R阻害剤としては、限定されるものではないが、BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MED1-573、およびBI836845が挙げられる。概説については、例えば、Yee, JNCI, 104; 975 (2012)を参照されたい。

【0263】

別の態様では、本発明は、限定されるものではないが、MEK阻害剤、Braf阻害剤、PI3K/Akt阻害剤、SHP2阻害剤、およびまたmTorなどの、1または複数のFGF下流シグナリング経路阻害剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することにより、がんを処置する方法を提供する。

20

【0264】

例えば、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MEK) 阻害剤としては、限定されるものではないが、XL-518 (ACC Corp. から入手可能な、GDC-0973、Cas No. 1029872-29-4としても知られる); 2-[(2-クロロ-4-ヨードフェニル) アミノ] -N-(シクロプロピルメトキシ)-3, 4-ジフルオロベンザミド (CI-1040またはPD184352としても知られ、PCT公開第WO2000035436号に記載されている); N-[(2R)-2, 3-ジヒドロキシプロポキシ] -3, 4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル) アミノ] -ベンザミド (PD0325901としても知られ、PCT公開第WO2002006213号に記載されている); 2, 3-ビス [アミノ [(2-アミノフェニル) チオ] メチレン] -ブタンジニトリル (U0126としても知られ、米国特許第2, 779, 780号に記載されている); N-[3, 4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル) アミノ] -6-メトキシフェニル] -1-[(2R)-2, 3-ジヒドロキシプロピル] -シクロプロパンスルホンアミド (RDEA119またはBAY869766としても知られ、PCT公開第WO2007014011号に記載されている); (3S, 4R, 5Z, 8S, 9S, 11E)-14-(エチルアミノ)-8, 9, 16-トリヒドロキシ-3, 4-ジメチル-3, 4, 9, 19-テトラヒドロ-1H-2-ベンゾオキサシクロテトラデシン-1, 7(8H)-ジオン] (E6201としても知られ、PCT公開第WO2003076424号に記載されている); 2'-アミノ-3'-メトキシフラボン (Biaffin GmbH & Co., KG, Germanyから入手可能なPD98059としても知られる); ベムラフェニブ (PLX-4032、CAS 918504-65-1); (R)-3-(2, 3-ジヒドロキシプロピル)-6-フルオロ-5-(2-フルオロ-4-ヨードフェニルアミノ)-8-メチルピリド [2, 3-d] ピリミジン-4, 7(3H, 8H)-ジオン (TAK-733、CAS 1035555-63-5); ピマセルチブ (AS-703026、CAS 1204531-26-9); およびトラメチニブジメチルスルホキシド (GSK-1120212、CAS 1204531-25-80) が挙げられる。

30

40

50

【0265】

ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) 阻害剤としては、限定されるものではないが、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[[4-(メチルスルホニル)ピペラジン-1-イル]メチル]チエノ[3, 2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリン (GDC0941としても知られ、PCT公開第WO09/036082号および第WO09/055730号に記載されている)；2-メチル-2-[4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2, 3-ジヒドロイミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]フェニル]プロピオニトリル (BEZ235またはNVP-BEZ235としても知られ、PCT公開第WO06/122806号に記載されている)；4-(トリフルオロメチル)-5-(2, 6-ジモルホリノピリミジン-4-イル)ピリジン-2-アミン (BKM120またはNVP-BKM120としても知られ、PCT公開第WO2007/084786号に記載されている)；トザセルチブ (VX680またはMK-0457、CAS639089-54-6)；(5Z)-5-[[4-(4-ピリジニル)-6-キノリニル]メチレン]-2, 4-チアゾリジンジオン (GSK1059615、CAS958852-01-2)；(1E, 4S, 4aR, 5R, 6aS, 9aR)-5-(アセチルオキシ)-1-[(ジ-2-プロペニルアミノ)メチレン]-4, 4a, 5, 6, 6a, 8, 9, 9a-オクタヒドロ-11-ヒドロキシ-4-(メトキシメチル)-4a, 6a-ジメチル-シクロペンタ[5, 6]ナフト[1, 2-c]ピラン-2, 7, 10(1H)-トリオン (PX866, CAS502632-66-8)；および8-フェニル-2-(モルホリン-4-イル)-クロメン-4-オン (LY294002、CAS154447-36-6)が挙げられる。

10

20

【0266】

mTorとしては、限定されるものではないが、テムシロリムス (Torisel (登録商標))；リダホロリムス (以前はデフェロリムス、(1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2-[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1, 18-ジヒドロキシ-19, 30-ジメトキシ-15, 17, 21, 23, 29, 35-ヘキサメチル-2, 3, 10, 14, 20-ペンタオキソ-11, 36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ-16, 24, 26, 28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネートとして知られ、AP23573およびMK8669としても知られ、PCT公開第WO03/064383号に記載されている)；エベロリムス (Afinitor (登録商標)またはRAD001)；ラバマイシン (AY22989、Sirolinus (登録商標))；シマピモッド (CAS164301-51-3)；(5-{2, 4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール (AZD8055)；2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7(8H)-オン (PF04691502、CAS1013101-36-4)；およびN²-[1, 4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L-α-アスパルチル-L-セリン-、内塩 (SF1126、CAS936487-67-1)が挙げられる。

30

40

【0267】

さらに別の態様において、本発明は、限定されるものではないが、IAP阻害剤、Bcl2阻害剤、Mcl1阻害剤、Trail剤、Chk阻害剤などの1または複数のプロアポトーシス剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することによりがんを処置する方法を提供する。

【0268】

例えば、IAP阻害剤としては、限定されるものではないが、LCL161、GDC-0917、AEG-35156、AT406、およびTL32711が挙げられる。IA

50

P阻害剤の他の例としては、限定されるものではないが、WO 04/005284、WO 04/007529、WO 05/097791、WO 05/069894、WO 05/069888、WO 05/094818、US 2006/0014700、US 2006/0025347、WO 06/069063、WO 06/010118、WO 06/017295、およびWO 08/134679（これらは全て参照により本明細書に組み込まれる）に開示されたものが挙げられる。

【0269】

BCL-2阻害剤としては、限定されるものではないが、4-[4-[[2-(4-クロロフェニル)-5, 5-ジメチル-1-シクロヘキセン-1-イル] メチル]-1-ピペラジニル]-N-[[4-[[(1R)-3-(4-モルホリニル)-1-[(フェニルチオ) メチル] プロピル] アミノ]-3-[(トリフルオロメチル) スルホニル] フェニル] スルホニル] ベンザミド (ABT-263としても知られ、PCT公開第WO 09/155386号に記載されている) ; テトロカルシンA ; アンチマイシン ; ゴシポール ((-) BL-193) ; オバトクラックス ; エチル-2-アミノ-6-シクロペンチル-4-(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチル)-4Hクロモン-3-カルボキシレート (HA14-1) ; オブリメルセン (G3139、Genasense (登録商標)) ; Bak BH3ペプチド ; (-)-ゴシポール酢酸 (AT-101) ; 4-[4-[(4'-クロロ [1, 1'-ビフェニル]-2-イル) メチル]-1-ピペラジニル]-N-[[4-[[(1R)-3-(ジメチルアミノ)-1-[(フェニルチオ) メチル] プロピル] アミノ]-3-ニトロフェニル] スルホニル]-ベンザミド (ABT-737、CAS 852808-04-9) ; およびナビトクラックス (ABT-263、CAS 923564-51-6) が挙げられる。

【0270】

DR4 (TRAILR1) およびDR5 (TRAILR2) などのプロアポトーシス受容体アゴニスト (PARA) としては、限定されるものではないが、デュラネルミン (AMG-951、RhApo2L/TRAIL) ; マバツムマブ (HRS-ETR1、CAS 658052-09-6) ; レキサツムマブ (HGS-ETR2、CAS 845816-02-6) ; アポマブ (Apomab (登録商標)) ; コナツムマブ (AMG 655、CAS 896731-82-1) ; およびチガツズマブ (CS1008、CAS 946415-34-5、Daiichi Sankyoから入手可能) が挙げられる。

【0271】

チェックポイントキナーゼ (CHK) 阻害剤としては、限定されるものではないが、7-ヒドロキシスタウロスポリン (UCN-01) ; 6-プロモ-3-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-5-(3R)-3-ピペリジニル-ピラゾロ [1, 5-a] ピリミジン-7-アミン (SCH900776、CAS 891494-63-6) ; 5-(3-フルオロフェニル)-3-ウレイドチオフエン-2-カルボン酸N-[(S)-ピペリジン-3-イル] アミド (AZD7762、CAS 860352-01-8) ; 4-[((3S)-1-アザビシクロ [2. 2. 2] オクタ-3-イル) アミノ]-3-(1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-6-クロロキノリン-2(1H)-オン (CHIR124、CAS 405168-58-3) ; 7-アミノダクチノマイシン (7-AAD) ; イソグラヌラチミド、デプロモヒメニアルジシン ; N-[5-プロモ-4-メチル-2-[(2S)-2-モルホリニルメトキシ]-フェニル]-N'-(5-メチル-2-ピラジニル) ウレア (LY2603618、CAS 911222-45-2) ; スルホラファン (CAS 4478-93-7、4-メチルスルフィニルブチルイソチオシアネート) ; 9, 10, 11, 12-テトラヒドロ-9, 12-エポキシ-1H-ジインドロ [1, 2, 3-fg: 3', 2', 1'-kl] ピロロ [3, 4-i] [1, 6] ベンゾジアゾシン-1, 3(2H)-ジオン (SB-218078、CAS 135897-06-2) ; およびTAT-S216A (YGRKKRRQRRRL YRSPAMPENL) 、およびCBP501 ((d-Bpa) sws (d-Phe-F5) (d-Cha) rrrqr r r) が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0272】

一態様では、本発明は、1または複数のF G F R阻害剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することにより、がんを処置する方法を提供する。例えば、F G F R阻害剤としては、限定されるものではないが、アラニン酸ブリバニブ（BMS-582664、（S）-（（R）-1-（4-（4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ）-5-メチルピロロ[2, 1-f][1, 2, 4]トリアジン-6-イルオキシ）プロパン-2-イル）2-アミノプロパノエート）；バルガテフ（BIBF1120、CAS 928326-83-4）；二酪酸ドビチニブ（TKI 258、CAS 852433-84-2）；3-（2, 6-ジクロロ-3, 5-ジメトキシフェニル）-1-〔6-〔4-（4-エチルピペラジン-1-イル）-フェニルアミノ〕-ピリミジン-4-イル〕-1-メチルウレア（BGJ 398、CAS 872511-34-7）；ダヌセルチブ（PHA-739358）；およびN-〔2-〔〔4-（ジエチルアミノ）ブチル〕アミノ〕-6-（3, 5-ジメトキシフェニル）ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-イル〕-N'-（1, 1-）ジメチルエチル）-ウレア（PD173074、CAS 219580-11-7）が挙げられる。特定の実施形態において、本発明は、3-（2, 6-ジクロロ-3, 5-ジメトキシフェニル）-1-（6-（（4-（4-エチルピペラジン-1-イル）フェニル）アミノ）ピリミジン-4-イル）-1-メチルウレア（BGJ-398としても知られる）；または4-アミノ-5-フルオロ-3-（5-（4-メチルピペラジン-1-イル）-1H-ベンゾ[d]イミダゾール-2-イル）キノリン-2（1H）-オン（ドビチニブもしくはTKI-258としても知られる）、AZD4547（Gavine et al., 2012, Cancer Research 72, 2045-56、N-〔5-〔2-（3, 5-ジメトキシフェニル）エチル〕-2H-ピラゾール-3-イル〕-4-（3R, 5S）-ジメチルピペラジン-1-イル）ベンザミド）、ポナチニブ（AP24534；Gozgit et al., 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99；3-〔2-（イミダゾ[1, 2-b]ピリダジン-3-イル）エチニル〕-4-メチル-N-〔4-〔（4-メチルピペラジン-1-イル）メチル〕-3-（トリフルオロメチル）フェニル〕ベンザミド、CAS 943319-70-8）などの他のF G F R 2阻害剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することにより、がんを処置する方法を提供する。

【0273】

医薬組成物

イムノコンジュゲートを含む医薬組成物または滅菌組成物を調製するために、本発明のイムノコンジュゲートを、薬学的に許容される担体または賦形剤と混合する。組成物は、がん（乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝臓がん、胃がん、膵臓がん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨肉腫、扁平上皮癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン腫、頭部および頸部がん、膀胱がん、食道がん、バレット食道がん、膠芽細胞腫、軟部組織の明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫、腎臓がん、黒色腫、前立腺がん、良性前立腺肥大症（BPH）、女性化乳房、横紋筋肉腫および子宮内膜症）を処置または防止するのに適している1つまたは複数の他の治療剤をさらに含有することができる。

【0274】

治療剤および診断剤の製剤を、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水性溶液、ローション、または懸濁液の形態で生理的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤と混合することにより調製することができる（例えば、Hardman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N

.Y., 2000を参照されたい)。

【0275】

特定の実施形態では、本発明の抗体薬物コンジュゲートの臨床サービス形態(CSF)は、ADC、コハク酸ナトリウム、およびポリソルベート20を含有するバイアル中の凍結乾燥物である。凍結乾燥物を注射用水で再構成させることができ、その溶液はADC、コハク酸ナトリウム、スクロース、およびポリソルベート20、pH約5.0を含む。その後の静脈内投与のために、得られる溶液は通常、担体溶液中にさらに希釈される。

【0276】

治療剤のための投与レジメンの選択は、実体の血清または組織代謝回転率、症状のレベル、実体の免疫原性および生物学的マトリックス中の標的細胞の接近可能性などのいくつかの因子に依存する。ある特定の実施形態において、投与レジメンは、許容される副作用レベルと一致する患者に送達される治療剤の量を最大化する。従って、送達される生物製剤の量は、特定の実体および処置される状態の重症度に一部依存する。適切な用量の抗体、サイトカイン、および小分子を選択する際の指針が利用可能である(例えば、Wawrzynzak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert et al., New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003; Milgrom et al., New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999; Slamon et al., New Engl. J. Med. 344:783-792, 2001; Beniaminovitz et al., New Engl. J. Med. 342:613-619, 2000; Ghosh et al., New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003; Lipsky et al., New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000を参照されたい)。

【0277】

適切な用量の決定は、例えば、処置に影響するか、または処置に影響すると予測されることが当業界で公知の、または疑われるパラメーターまたは因子を使用して、医師によって行われる。一般に、用量は最適用量よりもいくらか低い量から開始し、その後、任意の負の副作用と比較して所望の、または最適な効果が達成されるまで少しずつ増加させる。重要な診断尺度は、例えば、生成される炎症性サイトカインの炎症またはレベルの症状のものを含む。

【0278】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の用量レベル(dosage level)を、患者にとって毒性とならないように、特定の患者、組成物、および投与様式に対する所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るために変化させることができる。選択される用量レベルは、使用される本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、使用される特定の化合物の排出速度、処置の持続期間、使用される特定の組成物と共に使用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康および以前の病歴、ならびに医学界で公知の同様の因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。

【0279】

本発明の抗体またはそれらの断片を含む組成物は、連続注入により、または例えば1日、1週または1週につき1~7回、隔週に1回、3週ごとに1回、4週ごとに1回、5週ごとに1回、6週ごとに1回、7週ごとに1回、または8週ごとに1回の間隔での投与により供給され得る。用量を、静脈内、皮下、局所、経口、経鼻、直腸、筋肉内、大脳内で、または吸入により提供することができる。特定の用量プロトコールは、有意な望ましくない副作用を回避する最大用量または用量頻度を含むものである。

【0280】

本発明のイムノコンジュゲートに関して、患者に投与される用量は、0.0001mg/kg~100mg/kg患者体重であってもよい。用量は、0.0001mg/kg~20mg/kg、0.0001mg/kg~10mg/kg、0.0001mg/kg~5mg/kg、0.0001~2mg/kg、0.0001~1mg/kg、0.000

1 mg/kg ~ 0.75 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 0.5 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 0.25 mg/kg、0.0001 ~ 0.15 mg/kg、0.0001 ~ 0.10 mg/kg、0.001 ~ 0.5 mg/kg、0.01 ~ 0.25 mg/kg または 0.01 ~ 0.10 mg/kg 患者体重であってもよい。本発明の抗体またはその断片の用量を、キログラム患者体重 (kg) に、mg/kg で投与される用量を掛けたものを使用して算出することができる。

【0281】

本発明のイムノコンジュゲートの用量を反復し、投与を少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2カ月、75日、3カ月、または少なくとも6カ月空けてもよい。特定の実施形態においては、本発明のイムノコンジュゲートの用量を、3週間毎に反復する。

10

【0282】

特定の患者のための有効量は、処置される状態、患者の全体的な健康、投与の方法、経路および用量ならびに副作用の重症度などの因子に応じて変化してもよい（例えば、Maynard et al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001を参照されたい）。

【0283】

投与経路は、例えば、局所もしくは皮膚適用、静脈内、腹腔内、大脳内、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、病変内による注射もしくは輸注、または持続放出系もしくは埋込み体によるものであってもよい（例えば、Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983; Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980; 米国特許第6,350,466号および第6,316,024号を参照されたい）。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤または注射部位での疼痛を軽減するためのリドカインなどの局所麻酔剤、またはその両方を含んでもよい。さらに、例えば、吸入器または噴霧器、およびエアゾール化剤を含む製剤の使用により、肺投与を使用することもできる。例えば、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号、および第4,880,078;ならびにPCT公開第WO92/19244号、第WO97/32572号、第WO97/44013号、第WO98/31346号、および第WO99/66903号（それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

30

【0284】

本発明の組成物を、1または複数の当業界で公知の様々な方法を使用して、1または複数の投与経路により投与することもできる。当業者であれば理解できるように、投与の経路および/または様式は、所望の結果に応じて変化する。本発明のイムノコンジュゲートのために選択される投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは輸注による他の非経口投与経路が挙げられる。非経口投与は、通常は注射による、腸内投与および局所投与以外の投与様式であってもよく、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および輸注が挙げられる。あるいは、本発明の組成物を、局所、表皮または粘膜投与経路などの非経口経路により、例えば、鼻内的、経口的、経腔的、直腸的、舌下的または局所的に投与することができる。一実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは、輸注により投与される。別の実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは皮下投与される。

40

【0285】

本発明のイムノコンジュゲートを制御放出系または持続放出系において投与する場合、

50

ポンプを使用して制御放出または持続放出を達成することができる (Langer, supra; Sef ton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987; Buchwald et al., Surgery 88:507, 19 80; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574, 1989を参照されたい)。ポリマー材料 を使用して、本発明の療法の制御放出または持続放出を達成することができる (例えば、 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., B oca Raton, Fla., 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J . Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983を参照されたい; また、Levy et a l., Science 228:190, 1985; During et al., Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard et a l., J. Neurosurg. 7 1:105, 1989; 米国特許第 5, 6 7 9, 3 7 7 号; 米国特許第 5, 9 1 6, 5 9 7 号; 米国特許第 5, 9 1 2, 0 1 5 号; 米国特許第 5, 9 8 9, 4 6 3 号 ; 米国特許第 5, 1 2 8, 3 2 6 号; P C T 公開第 W O 9 9 / 1 5 1 5 4 号; および P C T 公開第 W O 9 9 / 2 0 2 5 3 号も参照されたい)。持続放出製剤において使用されるポリマーの例としては、限定されるものではないが、ポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ (メチルメタクリレート)、ポリ (アクリル酸)、ポリ (エチレン-コービニルアセテート)、ポリ (メタクリル酸)、ポリグリコリド (P L G)、ポリ無水物、ポリ (N-ビニルピロリドン)、ポリ (ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ (エチレングリコール)、ポリラクチド (P L A)、ポリ (ラクチド-コーグリコリド) (P L G A)、およびポリオルトエステルが挙げられる。一実施形態において、持続放出製剤において使用されるポリマーは、不活性であり、浸出性不純物を含まず、保存時に安定であり、無菌であり、および生分解性である。制御放出系または持続放出系を、予防または治療標的の近くに置き、かくして、全身用量のほんの一部のみを要することができる (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984を参照されたい)。

【0286】

制御放出系は、Langer, Science 249:1527-1533, 1990による概説で考察されている。当業者には公知の任意の技術を使用して、本発明の 1 または複数のイムノコンジュゲートを含む持続放出製剤を生成することができる。例えば、米国特許第 4, 5 2 6, 9 3 8 号、P C T 公開第 W O 9 1 / 0 5 5 4 8 号、P C T 公開第 W O 9 6 / 2 0 6 9 8 号、Ning e t al., Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996; Song et al., PDA Journal of Ph 30 armaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995; Cleek et al., Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997; および Lam et al., Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997 (それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0287】

本発明のイムノコンジュゲートを局所投与する場合、それらを軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、スプレー、エアゾール、溶液、乳濁液の形態、または当業者には周知の他の形態で製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sci ences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)を参照されたい。非スプレー可能局所剤形については、局所適用と適 40 合する担体または 1 もしくは複数の賦形剤を含み、いくつかの場合、水よりも高い動的粘度を有する粘性から半固体または固体の形態が典型的に使用される。好適な製剤としては、限定されるものではないが、必要に応じて、滅菌されるか、または例えば、浸透圧などの様々な特性に影響を及ぼすための補助剤 (例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤、バッファー、もしくは塩) と混合される、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、リミネント剤、蠟膏剤などが挙げられる。他の好適な局所剤形としては、いくつかの場合、固体または液体の不活性担体と組み合わせた活性成分が、加圧された揮発性物質 (例えば、フレオンなどの気体噴射剤) との混合物中、またはスクイーズボトル中に充填される、スプレー可能なエアゾール調製物が挙げられる。必要に応じて、モイスチャライザーまたは保湿剤を医薬組成物および剤形に添加することもできる。そのような追加の成 50

分の例は、当業界で周知である。

【0288】

イムノコンジュゲートを含む組成物を鼻内投与する場合、それをエアゾール形態、スプレー、ミストまたは液滴の形態で製剤化することができる。特に、本発明による使用のための予防剤または治療剤を、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適な気体）の使用と共に、加圧バックまたは噴霧器からのエアゾールスプレー提示物の形態で都合良く送達することができる。加圧エアゾールの場合、一定量を送達するためのバルブを提供することにより、用量単位を決定することができる。化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有する、吸入器または散布器における使用のためのカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンから構成される）を製剤化することができる。

10

【0289】

第2の治療剤、例えば、サイトカイン、ステロイド、化学療法剤、抗生物質、または放射線療法との同時投与または処置のための方法は、当業界で公知である（例えば、Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.を参照されたい）。治療剤の有効量は、症状を少なくとも10%；少なくとも20%；少なくとも約30%；少なくとも40%、または少なくとも50%減少させることができる。

20

【0290】

本発明のイムノコンジュゲートと共に投与することができるさらなる療法（例えば、予防剤または治療剤）を、本発明のイムノコンジュゲートから5分未満空けて、30分未満空けて、1時間空けて、約1時間空けて、約1～約2時間空けて、約2時間～約3時間空けて、約3時間～約4時間空けて、約4時間～約5時間空けて、約5時間～約6時間空けて、約6時間～約7時間空けて、約7時間～約8時間空けて、約8時間～約9時間空けて、約9時間～約10時間空けて、約10時間～約11時間空けて、約11時間～約12時間空けて、約12時間～約18時間空けて、18時間～24時間空けて、24時間～36時間空けて、36時間～48時間空けて、48時間～52時間空けて、52時間～60時間空けて、60時間～72時間空けて、72時間～84時間空けて、84時間～96時間空けて、または96時間～120時間空けて投与することができる。2つ以上の療法を、1回の同じ患者訪問のうちに投与してもよい。

30

【0291】

ある特定の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートを、*in vivo*での適切な分布を確保するように製剤化することができる。例えば、血液脳関門（BBB）は多くの高親水性化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBを通過することを確保するために（必要に応じて）、それらを、例えば、リポソーム中で製剤化することができる。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号；第5,374,548号；および第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器中に選択的に輸送される1または複数の部分を含み、かくして、標的化薬物送達を増強してもよい（例えば、Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。標的化部分の例としては、葉酸またはビオチン（例えば、Low et al.の米国特許第5,416,016号を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140；Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；界面活性プロテインA受容体（Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233:134）；p120（Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）が挙げられ、K. Keinänen；M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J. J. Killian；I. J. Fidler (1994) Immun

40

50

omethods 4:273も参照されたい。

【0292】

本発明は、単独で、または他の療法と組み合わせた本発明のイムノコンジュゲートを含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するためのプロトコルを提供する。本発明の併用療法の治療法（例えば、予防剤または治療剤）は、対象へ同時にまたは順次投与され得る。本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防剤または治療剤）を、周期的に投与することもできる。周期的療法は、療法（例えば、薬剤）の1つに対する耐性の発生を軽減するため、療法（例えば、薬剤）の1つの副作用を回避もしくは軽減する、および／または療法の効能を改善するための、一定期間、第1の療法（例えば、第1の予防剤または治療剤）の投与、次いで、一定期間、第2の療法（例えば、第2の予防剤または治療剤）の投与、およびこの連続的投与の反復、すなわち、周期を含む。

10

【0293】

本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防剤または治療剤）を、対象に同時に投与することができる。

【0294】

用語「同時に」は、正確に同時の療法（例えば、予防剤または治療剤）の投与に限定されないが、むしろ、本発明の抗体またはその断片を含む医薬組成物が対象に連続して、および本発明の抗体が他の療法（複数可）と一緒に作用して、それらを別途投与した場合よりも増大した利益を提供し得るような時間間隔で投与されることを意味する。例えば、それぞれの療法を同時に、または異なる時点で任意の順序で連続的に投与することができる；しかしながら、同時に投与しない場合、それらを十分に近い時間で投与して、所望の治療または予防効果を提供すべきである。それぞれの療法を、任意の適切な形態で、および任意の好適な経路により、別々に対象に投与することができる。様々な実施形態において、療法（例えば、予防剤または治療剤）を、15分未満空けて、30分未満空けて、1時間未満空けて、約1時間空けて、約1～約2時間空けて、約2時間～約3時間空けて、約3時間～約4時間空けて、約4時間～約5時間空けて、約5時間～約6時間空けて、約6時間～約7時間空けて、約7時間～約8時間空けて、約8時間～約9時間空けて、約9時間～約10時間空けて、約10時間～約11時間空けて、約11時間～約12時間空けて、24時間空けて、48時間空けて、72時間空けて、または1週間空けて対象に投与する。他の実施形態において、2以上の療法（例えば、予防剤または治療剤）を、同じ患者訪問のうちに投与する。

20

30

【0295】

組合せ療法の予防剤または治療剤を、同じ医薬組成物中で対象に投与することができる。あるいは、組合せ療法の予防剤または治療剤を、別々の医薬組成物中、対象に同時に投与することができる。予防剤または治療剤を、同じか、または異なる投与経路により対象に投与してもよい。

【実施例】

【0296】

下記実施例および中間体は、本発明の範囲を限定することなく、本発明を説明するのに役立つ。

40

【0297】

実施例1： 抗FGFR2／4抗体に関するスクリーニング

細胞株

Ba／F3細胞は、DSMZから購入し、KatoIII、SNU16、SNU5およびHCI-H716細胞は、American Type Culture Collection（ATCC）から購入されて、NUGC3細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources（JCRB）Cell Bankから入手した。細胞株は全て、それぞれの供給業者により推奨されるように、ウシ胎児血清アルブミン（FBS）を補充した適切な成長培地中で日常的に培養された。

50

【 0 2 9 8 】

組換えヒト、カニクイザル、マウスおよびラット F G F R ベクターの生成

ヒト、マウスおよびラット F G F R 細胞外ドメインは、G e n B a n k または U n i p r o t データベース由来のアミノ酸配列に基づいて合成された遺伝子であった（表 2 を参照）。カニクイザル F G F R 2 および 4 E C D c D N A 鋳型は、各種カニクイザル組織由来の m R N A を使用して生成したアミノ酸配列情報に基づいて合成した遺伝子であった（例えば、Z y a g e n L a b o r a t o r i e s、表 3）。合成された D N A 断片は全て、精製を可能にするための C 末端タグを用いて、適切な発現ベクター、例えば C M V に基づくベクターまたは p C D N A（商標）3.1 ヘクローニングした。

【 0 2 9 9 】

【表 2】

表 2. FGFR 発現ベクターの生成。アミノ酸の番号付けは、表に提供される受託番号または配列番号に基づく。

名称	詳細	受託番号	配列番号
ヒト FGFR1 IIIb D1-3	ヒト FGFR1 アイソフォーム IIIb、残基 22-373-TAG	NM_015850	121
ヒト FGFR2 IIIb D1-3	ヒト FGFR2 アイソフォーム IIIb、残基 22-378-TAG	NM_022970/ P21802-3	122
ヒト FGFR3 IIIb D1-3	ヒト FGFR3 アイソフォーム IIIb、残基 23-377-TAG	NM_000142	123
ヒト FGFR4 ECD	ヒト FGFR4 細胞外ドメイン、残基 22-369-TAG	NM_002011; P22455	124
ヒト FGFR2 IIIc D1-3	ヒト FGFR2 アイソフォーム IIIc、残基 22-378-TAG	NM_022970/ P21802-1	125
カニクイザル FGFR2 IIIb D1-3	カニクイザル FGFR2 アイソフォーム IIIb、残基 22-378-TAG	該当なし	126
マウス FGFR2 IIIb D1-3	マウス FGFR2 アイソフォーム IIIb、残基 22-378-TAG	NM_010207	127
ラット FGFR2 IIIb D1-3	ラット FGFR2 アイソフォーム IIIb、残基 41-397-TAG	XM_001079450	128
ラット FGFR4	ラット FGFR4、残基 17-367-TAG	NM_001109904	129
カニクイザル FGFR4	カニクイザル FGFR4、残基 17-366-TAG	該当なし	130
マウス FGFR4	マウス FGFR4、残基 17-366-TAG	マウス NM_008011	131

【 0 3 0 0 】

10

20

30

【表 3】

表 3: カニクイザルFGFR2およびFGFR4タンパク質の配列

構築物	1文字コードでのアミノ酸配列	配列番号
カニクイザル FGFR2 IIIb D1-3 Cynomolgus monkey FGFR2 IIIb D1-3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGRPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQIS QPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLI GEYLQIKGATPRDSGLYACTATRTVDSETWYFMVNVTDAISSG DDEDDTDGAEDFVSENGNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAA NTVKFRCPAGGNPTPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHW SLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSHPRPIL QAGLPANASTVVG DVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSK YGPDGLPYLKVLKHSINSSNAEVLALFNVTADAGEYICKVSN YIGQANQSAWLT VLPKQQAPGREKEITASPDYLEKLEFRHDSGL NDIFEAQKIEWHE	126
カニクイザル FGFR4	METDTLLLWVLLLWVPGSTGLEASEEVELEPCLAPSMEQQEQE LTVALGQPVRLLCCGRAERGHHWYKEGSRLAPAGRVRGWRGRL EIASFLPEDAGRYLCLARASMIVLQNVTLTIDDSLTSNDDDPQ SHRDSSNGHIYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCP AAGNPTPTIRWLKDGQAFHGENRIGGIRLRHQHWSLV MESVVP SDRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDVLERSHPRPILQAGLPANTT AVVGSDVELLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYVQ VLKTADINSSEVEVLYLRNVSAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSA WLT VLP EEDLTWTAATPEARYTDKLEFRHDSGLNDIFEAQKIE WHE	130

【0301】

組換え F G F R タンパク質の発現

所望の F G F R 組換えタンパク質は、予め懸濁培養に適応されて、無血清培地、L-グルタミンを伴わない 50% HyClone (商標) SFM4 Transfx-293 (HyClone (商標)) および 50% FreeStyle-293 (Gibco (登録商標)) のミックス中で成長させた HEK293 由来の細胞株 (293T) で発現させた。小規模および大規模の両方のタンパク質生産は、一過性トランスフェクションを介したものであり、プラスミド担体としてポリエチレンジオキサン (PEI、25K、Alfa Aesar (登録商標)) を有するそれぞれ最大 1 L の多重振とう機フラスコ (Nalgene (登録商標)) 中で実施した。ジオチン化タンパク質が、C 末端 Avi タグを介して発現されるべきであった場合、BirA 酵素に関する遺伝子を保有するプラスミドは、ECD タンパク質プラスミドに対して 1:2 の比で含まれた。総 DNA およびポリエチレンジオキサンは、1:3 (w:w) の比で使用された。DNA 対培養物の比は 1 mg/L であった。細胞培養物上清は、トランスフェクションの 6 日後に収集して、遠心分離して、精製前に滅菌濾過した。

【0302】

タグ付けタンパク質精製

組換えタグ付け F G F R 2 および F G F R 4 ECD タンパク質 (例えば、APP-F

GFR2およびAPP-FGFR4 ECD)は、細胞培養物上清を収集することにより精製した。抗APPカラムは、樹脂1mL当たり抗体10mgの最終比で、抗APPモノクローナル抗体をCNBr活性化Sephacryl S4Bヘカプリングすることにより調製した。発現上清を、1~2mL/分の流速で、または重力流により、抗APPカラムに適用させた。PBSを用いたベースライン洗浄後、結合された材料を100mMグリシン(pH2.7)で溶出させて、PBSに対して一晚、即座に透析した後、滅菌濾過した。タンパク質濃度は、280nmでの吸光度を測定して、個々のタンパク質のアミノ酸配列に基づいて算出されるタンパク質吸光係数を使用して変換することにより決定した。次に、精製したタンパク質を、SDS-PAGE、分析用サイズ排除クロマトグラフィー(HPLC-SEC)により特徴付けた。親和性精製した調製物中に10%を上回る凝集物を有するものに関して、第2のステップであるSEC精製を実施して、続いて確認特徴付けを行った。

【0303】

Ba/F3 FGFR2細胞株の生成

これらの細胞を生成するために、ヒトFRGR2-IIIB-C3(NM_022970)をpENTR(商標)TOPOD(登録商標)ベクター(Invitrogen Cat#K2400-20)へクローニングした後、CMVプロモーター下でpLenti6 DEST(商標)ベクター(Invitrogen Cat#V49610)へクローニングした。次に、ウイルスをパッケージングして、Ba/F3細胞(DSMZ Cat#ACC300)にレンチウイルスを遠心感染させて、続いてブラストサイジン(例えば、Invitrogen、Cat#A11139-03またはCellgro(登録商標)、Cat#30-100-RB)20μgで処置して、37℃および5%CO₂で組織培養インキュベーター中で5日間、IL3(R&D systems Cat#403-ml-010)を用いて選択した。続いて、生存細胞を、培地(10%FBS(Clonetech Cat#631101)、2μg/mlのヘパリン(Sigma、Cat#H3149)および20μg/mlのブラストサイジン(例えば、Invitrogen、Cat#A11139-03またはCellgro(登録商標)、Cat#30-100-RB)を補充したが、IL3を有さないRPMI(Invitrogen Cat#11875-093)中で1カ月間成長させた。続いて、生存細胞を希釈クローニングして(dilution cloned)、クローン細胞集団を生成し、続いてこれらを、続く研究に使用した。

【0304】

HuCAL PLATINUM(登録商標)パンニング

ヒトFGFR2を認識する抗体の選択のために、複数のパンニング戦略を使用した。抗体バリエーションタンパク質の供給源として商業的に入手可能なファージディスプレイライブラリー、Morphosys HuCAL PLATINUM(登録商標)ライブラリーを使用して、FGFR2に結合するクローンの選択により、ヒトFGFRタンパク質に対する治療抗体を作成した。このファージミドライブラリーは、HuCAL(登録商標)コンセプト(Knappik et al., 2000, J Mol Biol 296: 57-86)に基づくものであり、ファージ表面上にFabを展示するためにCys Display(商標)技術を使用する(WO 01/05950)。

【0305】

抗FGFR2抗体の単離に関して、固相、溶液、ホールセルおよびディファレンシャルホールセルアプローチを使用した幾つかの異なるパンニング戦略を用いた。

【0306】

組換えFGFR2上での固相パンニング

抗原選択プロセスに先立って、コーティングチェックELISAを実施して、抗原に関して最適なコーティング濃度を決定した。各種タグを有する異なる組換えFGFR2タンパク質は、受動的吸着により、または抗原の各々のタグを標的とする捕捉抗体により、Maxisorp(商標)プレート(Nunc(登録商標))上にコーティングすることに

より、固相パニングアプローチで使用された。あるいは、Reacti-Bind（商標）NeutrAvidin（商標）でコーティングされたポリスチレンストリッププレート（Pierce）を使用して、ビオチン化FGFR2抗原を捕捉した。96ウェルMaxisorp（商標）プレート（Nunc（登録商標））の適切な数（サブライブラリープールの数に応じる）のウェルを、4℃で一晩、抗原でコーティングした。コーティングされたウェルを、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）／5%粉乳でブロックした。各パニングに関して、おおよそHuCAL PLATINUM（登録商標）ファージ抗体をブロックした。ブロッキング手順後、予めブロックしたファージミックスを、抗原でコーティングしてブロックしたウェルそれぞれに添加して、マイクロタイタープレート（MTP）振とう機上で室温（RT）で2時間（h）インキュベートした。その後、非特異的な結合ファージを、幾つかの洗浄ステップにより洗い流した。特異的に結合されるファージの溶出に関して、25mMのDTT（ジチオスレイトール）をRTで10分（min）間添加した。DTT溶出液を、E. コリ（E. coli）（大腸菌（Escherichia coli））TG-1細胞の感染に使用した。感染後、細菌をLB（溶原性ブロス）／Cam（クロラムフェニコール）寒天プレート上で平板培養して、30℃で一晩インキュベートした。コロニーをプレートからこすり落として、ファージレスキュー、選択クローンのポリクロナル増幅およびファージ生産に使用した。各FGFR2固相パニング戦略は、パニングの個々のラウンドを含み、特有の抗原、抗原濃度、緩衝液組成物および洗浄ストリンジェンシーを含有した。

10

【0307】

20

ストレプトアビジンとカップリングさせた磁気ビーズを用いた組換えFGFR2上での溶液パニング

溶液パニングアプローチに関する必要条件は、抗原のビオチン化、およびビオチン化抗原の保持活性の確認であった。溶液パニング中、Fabディスプレイファージおよびビオチン化抗原を、ファージによる抗原の到達性を促進する溶液中でインキュベートした。

【0308】

各ファージプールに関して、ストレプトアビジンビーズ（Dynabeads（登録商標）M-280ストレプトアビジン、Invitrogen）を1×Chemiblocker（商標）中でブロックした。並行して、各パニングに関して、おおよそHuCAL PLATINUM（登録商標）ファージ抗体を、等量の2×Chemiblocker（商標）／0.1%ツイーン20を用いてブロックした。続いて、ある特定濃度のビオチン化抗原（例えば、100nM）を、予め吸着およびブロックさせたファージ粒子に添加して、回転子上でRTで1～2時間インキュベートした。ファージ抗原複合体を、ブロックしたストレプトアビジンビーズを使用して捕捉して、ストレプトアビジンビーズに結合したファージ粒子を、磁気分離器で収集した。非特異的な結合ファージを、幾つかの洗浄ステップにより洗い流した。ストレプトアビジンビーズからの特異的に結合されるファージの溶出に関して、25mMのDTTをRTで10分間添加した。DTT溶出液を固相パニングに関して記載するように加工処理した。

30

【0309】

各FGFR2溶液相パニング戦略は、パニングの個々のラウンドを含み、特有の抗原、抗原濃度および洗浄ストリンジェンシーを含有した。

40

【0310】

FGFR2過剰発現性細胞上でのホールセルパニング

各細胞パニングに関して、HuCAL PLATINUM（登録商標）ファージ抗体をPBS／FCS中で予めブロックした。並行して、FGFR2の過剰発現を示すファージプール（FGFR2、Kato-III、SNU16、H716で安定にトランスフェクトしたBa/F3細胞）1つ当たり0.5～1.0×10⁷個の標的細胞を、氷上でPBS／FCS中に再懸濁した。

【0311】

50

ブロックした標的細胞を遠沈させて、予めブロックしたファージ粒子中に再懸濁させて、回転子上で4℃で2時間インキュベートした。ファージ細胞複合体を、PBS/FCS中で洗浄した。標的細胞からの特異的に結合されるファージの溶出は、グリシン緩衝液(pH 2.2)を用いた酸性溶出により実施された。遠心分離後、緩衝されていないトリスを添加することにより、上清(溶出液)を中和した。最終的なファージ含有上清は、E. コリ(E. coli) TG1培養物の感染に使用した。下記ステップは、固相パニングのセクションで記載されるように行った。

【0312】

より詳細には、各パニングランドが細胞を用いて実施される場合のいずれかのホールセルパニングが実施されるか、あるいは各細胞または組換えタンパク質が、連続的なパニンググラウンドで使用されることを意味するディファレンシャルホールセルパニングが実施された。組換え抗原に関する選択ラウンドは、固相または溶液パニングに関して記載するように実施された。

10

【0313】

成熟パニング

増加された親和性を有するFGFR2特異的抗体を得るために、成熟パニングを実施した(Prassler et al., 2009, Immunotherapy, 1: 571-583)。この目的で、標準的なパニング(固相および溶液相パニング)を、上述するように異なるFGFR2抗原を用いて実施した。

【0314】

パニング後、ファージ由来のpMORPH30(登録商標)ベクターDNAのFabコード断片を、別個の特異的な制限酵素で消化して、LCDR3またはHCDR2成熟ライブラリーのいずれかを生成した。TRIM(商標)技術を使用して、挿入物を置き換えた(Virnekas et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 5600-5607)。

20

【0315】

生成したライブラリーを増幅して、洗浄ストリンジェンシーの増加および抗原濃度の低減を用いてさらに2回のラウンドのパニングに付した。

【0316】

選択Fab断片のサブクローニングおよび微量発現(Microexpression)

可溶性Fabの迅速な発現を促進するために、選択したHuCAL PLATINUM(登録商標)ファージのFabコード挿入物を、pMORPH(登録商標)30ディスプレイベクターから、pMORPH(登録商標)x11発現ベクターpMORPH(登録商標)x11_FHへサブクローニングした。

30

【0317】

E. コリ(E. coli) TG1-F⁻の形質転換後、HuCAL(登録商標)-Fab断片を含有するペリプラズム抽出物の単クローン発現および調製は、これまでに記載されるように実施した(Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem 278: 38194-38205)。

【0318】

ELISAスクリーニング

ELISAスクリーニングを使用して、単一Fabクローンを、標的抗原への結合に関してパニングアウトプットから同定する。Fabは、Fab含有粗製E. コリ(E. coli)溶解産物を使用して試験した。

40

【0319】

Maxisorp(商標)(Nunc(登録商標))384ウェルプレートを、対象のFGFR抗原で、それらのこれまでの決定飽和濃度でPBS中でコーティングした(受動的吸着により、または抗原の各々のタグを標的とする捕捉抗体により)。あるいは、Reacti-Bind(商標)NeutrAvidin(商標)でコーティングされたポリスチレンストリッププレート(Pierce)を使用して、ビオチン化FGFR2抗原を捕捉した。

【0320】

50

PBS中の5%スキムミルク粉末でプレートを遮断した後、Fab含有大腸菌(E.coli)溶解物を添加した。Fabの結合を、Attosphos(登録商標)蛍光基質(Roché、Cat#11681982001)を使用してアルカリホスファターゼにコンジュゲートされたF(ab)₂特異的ヤギ抗ヒトIgG(1:5000希釈)により検出した。535nmでの蛍光放出を、430nmで励起して記録した。

【0321】

FACSスクリーニング(蛍光標識細胞分取)

FACSスクリーニングでは、細胞表面発現抗原に対する単一Fabクローン結合は、パニングアウトプットから同定される。Fabは、Fab含有粗製E. コリ(E. coli)溶解産物を使用して、細胞結合に関して試験される。

10

【0322】

これらの研究では、細胞懸濁液100μlを、新鮮な96ウェルプレートへ移した(1×10⁵個の細胞/ウェルをもたらす)。標的細胞懸濁液含有プレートを遠心分離して、上清を廃棄した。残存細胞ペレットを再懸濁させて、Fab含有細菌抽出物50μlを相当するウェルに添加した。

【0323】

あるいは、細胞ペレットを再懸濁して、FACS緩衝液(PBS、3%FCS)50μlおよび同容量のFab含有細菌抽出物を相当するウェルに添加した。

【0324】

次に、細胞-抗体懸濁液を氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を遠沈させて、FACS緩衝液200μlで3回洗浄した。各洗浄ステップ後、細胞を遠心分離して、慎重に再懸濁させた。

20

【0325】

二次検出抗体(PEとコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgG、Dianova)を添加して、試料を氷上でインキュベートして、次に、Fabインキュベーションに従って洗浄した。蛍光強度は、FACSArray(商標)機器で決定した。

【0326】

HuCAL(登録商標)Fab断片の発現および精製

Fab断片の発現は、E. コリ(E. coli)TG1F-細胞で実施した。培養物を30℃で18時間振とうさせた。細胞を収集して、リゾチームおよびBug Buster(登録商標)タンパク質抽出試薬(Novagen、ドイツ)の組合せを使用して崩壊させた。His6でタグ付けしたFab断片をIMAC(Qiagen(登録商標)、ドイツ)によって単離して、タンパク質濃度をUV分光光度法により決定した。代表的に選択される試料の純度は、変性還元性15%SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動)で解析した。

30

【0327】

Fab調製物の均質性は、校正標準物質を用いたサイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)により自然状態で決定された。

【0328】

IgGへの変換およびIgG発現

40

完全長IgGを発現するために、重鎖(VH)および軽鎖(VL)の可変ドメイン断片を、ヒトIgG1に関して、Fab発現ベクターから適切なpMorph(登録商標)-hIgベクターへサブクローニングした。あるいは、真核生物HKB11細胞をpMorph(登録商標)4発現ベクターDNAでトランスフェクトした。細胞培養物上清を、トランスフェクションの3日後または7日後に収集した。滅菌濾過後、溶液を、液体ハンドリングステーションを使用してプロテインAアフィニティークロマトグラフィー(Mab Select SURE(商標)、GE Healthcare)に付した。別記されない場合には、緩衝液交換は、1×ダルベッコPBS(pH7.2、Invitrogen)へ実施され、試料は滅菌濾過された(孔サイズ0.2μm)。タンパク質濃度をUV分光光度法により決定して、IgGの純度は、Caliper Labchip(登録商標

50

）を使用して、またはSDS-PAGEで、変性還元性条件下で解析した。

【0329】

バイオアッセイ

上述するパニングプロセス後に得られる抗FGFR抗体を、以下で例示されるアッセイで評価した：

【0330】

BaF3/CMV-FGFR111B-C3細胞増殖アッセイ

抗FGFR2抗体の、FGF1依存性細胞増殖を阻害する能力を決定するために、増殖アッセイは、各々のキナーゼドメインを保有する完全長FGFR2111b受容体ECDおよびFGFR-1細胞内ドメインのキメラで安定に形質導入された操作Ba/F3細胞株（BaF3/CMV-FGFR111B-C3）を使用して実施した。ヒトFGF1の添加が、この細胞株において細胞増殖を促進した。

10

【0331】

細胞を完全成長培地（RPMI+10%FCS+30ng/mlのFGF1+2μg/mlのヘパリン+20μg/mlのブラストサイジン）中に再懸濁して、80μl中に8×10³個の細胞/ウェルの細胞密度で平底白色96ウェルアッセイプレート（Corning（登録商標）Costar、#3903）へ播種して、37℃および5%CO₂で一晩インキュベートした。

【0332】

翌日、HuCAL（登録商標）抗体（FabまたはIgG）を所望の濃度（5倍濃縮）へ完全成長培地中で希釈した。抗体溶液20μlを、前日の播種細胞に添加して、細胞を72時間培養した。72時間後、Cell Titer-Glo（商標）発光細胞生存率アッセイ試薬（#G7571、Promega）100μlを各ウェルに添加して、わずかに振とうしてRTで15分間インキュベートして、続いて照度計（Genios Pro、Tecan）で発光を読み出した。最大半量阻害濃度（IC₅₀値）の決定に関して、Fab/IgG滴定を実施して、GraphPad Prismを使用してIC₅₀を算出した。

20

【0333】

HuCAL（登録商標）IgGの潜在的なアゴニスト活性の評価に関して、抗体の、外因性FGF1の非存在下で操作BaF/3細胞の増殖を促進する能力により決定されるように、細胞およびIgGを希釈培地（FGF1を有さない完全成長培地）中に希釈した。細胞の播種およびIgGの添加は、同日に行った。

30

【0334】

親和性決定

K_D決定に関して、抗体タンパク質の単量体分画を使用した（単量体含有量少なくとも90%、解析用SECにより解析、それぞれ、Fabに関してはSuperdex（商標）75（Amersham Pharmacia）、またはIgGに関してはTosoh G3000SWXL（Tosoh Bioscience））。

【0335】

（a）Sector（登録商標）Imager 6000（Mesoscale discovery（登録商標））を使用したK_D決定のための溶液平衡滴定（SET）法

40

溶液中の親和性決定は、基本的には文献（Friguet et al., 1985 J Immunol Methods 77: 305-319）に記載されるように実施された。SET法の感度および精度を改善するために、それは、古典的なELISAからECLに基づく技術に移された（Haenel et al., 2005 Anal Biochem 339: 182-184）。HuCAL（登録商標）—IgGのK_D決定は、下記試薬：標準的なMSDプレート上で4℃で一晩PBS中で0.5μg/mlでコーティングされたビオチン化hFGFR2を使用して、記載されるように実施した。

【0336】

MSDプレートを洗浄し、30μl/ウェルのMSD Read Buffer Tを界面活性剤と共に添加した後、電気化学発光シグナルをSector（登録商標）Ima

50

ger 6000 (Mesoscale Discovery (登録商標)、Gaithersburg, MD, USA) を使用して検出した。

【0337】

データを、カスタマイズされた適合モデルを適用するXLfit (商標) (IDBS) ソフトウェアを使用して評価した。Fab分子の K_D 決定のために、以下の適合モデルを使用した (Haenel et al., 2005 Anal Biochem 339:182-184) に従う) :

【0338】

【数1】

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right) \quad 10$$

($[Fab]_t$: 適用される全Fab濃度

x : 適用される全可溶性抗原濃度 (結合部位)

$B_{\max}$: 抗原を含まないFabの最大シグナル

K_D : 親和性

である)。

【0339】

IgG分子の K_D 決定に関して、IgGに関する下記フィットモデルが使用され (Piehler et al., 1997 J Immunol Methods 201: 189-206に従って修飾される)、データの概要を図1に示す:

20

【0340】

【数2】

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left(\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right) \quad 30$$

($[IgG]$: 適用される全IgG濃度

x : 適用される全可溶性抗原濃度 (結合部位)

$B_{\max}$: 抗原を含まないIgGの最大シグナル

K_D : 親和性

である)。

【0341】

パニング戦略およびスクリーニングの概要

総計で、上記で概要するように組換え抗原材料ならびに細胞株を使用した28個の異なるパニング戦略を用いた。上述するアッセイを使用して、パニングアウトプットを、特異性および交差反応性に関してスクリーニングして、935個のクローンを配列決定に関して選択した。上述するスクリーニングプロセス後に、以下の実施例で記載されるように、さらなる特徴付けに関して、15個の抗体を選択した。これらの抗体のうち、12433、12947、10846および12931は、FGFR2 IIIbアイソフォーム (Uniprot 受託#P21802-3) に結合することがわかり、10164、11725、10220、11723および12944は、両方のヒトFGFR2 IIIb (Uniprot 受託#P21802-3) およびIIIcアイソフォーム (Uniprot 受託#P21802-1) に結合することがわかり、12425、12422、12439、10918、10923および11722は、両方のヒトFGFR2 IIIb (Uniprot 受託#P21802-3) およびIIIcアイソフォーム (Uniprot 受託#P21802-1) および同様にヒトFGFR4 (Uniprot

40

50

受託# P 2 2 4 5 5) に結合することがわかった。

【0342】

実施例2： 親和性決定

F G F R 2 種オルソログに対する、および同様に F G F R 4 に対する抗体の親和性を、B i a c o r e (登録商標) 技術を使用して、B i a c o r e (登録商標) T 1 0 0 機器 (G E S y s t e m s) を使用して、および C M 5 センサーチップを用いて決定した。

【0343】

簡潔に述べると、0.5 mg/ml の B S A および 10 μg/ml のヘパリンを補充した H B S - E P ⁺ (0.01 M H E P E S , p H 7.4、0.15 M N a C l、0.005 % 界面活性剤 P 2 0) を、全ての実験に関して実行緩衝液として使用した。固定化レベルおよび分析物相互作用は、応答単位 (R U) により測定した。パイロット実験を実施して、抗ヒト F c 抗体の固定化の実現可能性および試験抗体の捕捉を試験ならびに確認した。

10

【0344】

動態測定に関して、抗体がセンサーチップ表面上に固定化された実験を実施して、表1に列挙される上述する F G F R タンパク質の、遊離溶液中で結合する能力を決定した。簡潔に述べると、R U 6000 に達するように、p H 4.75 の 50 μg/ml の抗ヒト F c 抗体を、4 つ全てのフローセル上に流速 10 μl/分 でアミンカップリングによって C M 5 センサーチップ上に固定化した。続いて、3 μg/ml の試験抗体を、10 μl/分 で 10 秒間注入した。抗体の固定化レベルが概して、250 未満の R U に維持された。続いて、2 倍系列で希釈した 0.078 ~ 100 nM の F G F R 受容体を、流速 80 μl/分 で 7 分間、参照および試験フローセルの両方にわたって注入した。実行緩衝液として 0.5 mg/ml の B S A および 10 μg/ml のヘパリンを補充した H B S - E P ⁺ を使用して、結合の解離を 10 分間行った。各注入サイクル後に、チップ表面を、p H 2.0 で、60 μl/分 で 70 秒間、10 mM グリシンで再生させた。実験は全て、25 °C で実施して、応答データは、全体的に簡素な 1 : 1 相互作用モデルでフィッティングさせて (評価ソフトウェアバージョン 1.1 (G E S y s t e m s) を使用して)、速度 (K_a)、オフ速度 (K_d) および親和性 (K_D) の推定値を得た。

20

【0345】

F G F R 2 I I I b 種オルソログおよび F G F R 4 に対して得られた親和性推定値の概要を表4に示す。抗体の全てが評価した F G F R 2 の種オルソログに結合されることが、および抗体のサブセットはまた、ヒト F G F R 4 にも結合されることがわかった。さらに、幾つかの抗体 (10846、12433、12931 および 12947) は、ヒト F G F R 2 の I I I c アイソフォーム (U n i p r o t 受託# P 2 1 8 0 2) に結合することができなかった。抗体の全てが、F G F R 2 に特異的であるか、または F G F R 2 および F G F R 4 の両方に結合され、抗体はいずれも、F G F R 1 または F G F R 3 にはっきりと結合しないことがわかった。

30

【0346】

【表 4】

表 4. FGFR2 IIIb種オルソログおよびFGFR4に対して得られる親和性推定値

抗体 ID	親和性推定値 Affinity estimate (K_D) (M)				
	ヒト FGFR2 IIIb	マウス FGFR2 IIIb	ラット FGFR2 IIIb	カキザル Cyno FGFR2 IIIb	ヒト FGFR4
10164	1.9E-08	3.3E-08	3.5E-08	1.6E-08	N.B.
10220	1.6E-08	2.6E-08	2.6E-08	2.6E-08	N.B.
10846	1.4E-12	1.5E-08	1.3E-08	2.3E-08	N.B.
10918	7.7E-10	1.1E-09	1.3E-09	1.3E-09	1.8E-09
10923	3.7E-09	4.0E-09	5.5E-09	4.5E-09	6.4E-09
11722	1.3E-08	1.8E-08	2.1E-08	1.3E-08	1.1E-08
11723	1.8E-08	2.8E-08	5.3E-08	1.7E-08	N.B.
11725	2.6E-08	1.3E-07	1.4E-07	7.3E-09	N.B.
12422	5.1E-09	7.7E-09	9.7E-09	7.4E-09	9.5E-10
12425	1.4E-08	1.6E-08	2.2E-08	1.2E-08	3.9E-09
12433	5.6E-09	8.0E-09	1.2E-08	1.2E-08	N.B.
12439	1.5E-08	1.5E-08	1.6E-08	5.6E-09	4.3E-09
12931	3.4E-09	1.2E-09	2.9E-09	2.4E-09	N.B.
12944	9.4E-09	6.9E-09	1.1E-08	1.0E-08	N.B.
12947	2.7E-09	3.1E-09	5.1E-09	2.4E-09	N.B.

【0347】

実施例 3： 抗 FGFR 抗体の機能活性の評価

精製抗体の、FGFR2 のアゴニストまたはアンタゴニストのいずれかとして作用する能力を、Baf 細胞が FGFR2 を過剰発現するように形質導入された Baf 細胞系を使用して評価した。

【0348】

抗体の潜在的なアゴニスト特性を評価するために、Baf-FGFR2 細胞を PBS 中で 2 度洗浄して、希釈培地（10% FBS、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヘパリン（Sigma、Cat # H3149）および $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプラストサイジン（例えば、Invitrogen、Cat # A11139-03 または Cellgro（登録商標）、Cat # 30-100-RB）を補充した RPMI）中に再懸濁した後、希釈培地 $90 \mu\text{l}$ 中で 8000 個の細胞/ウェルで 96 ウェルプレート（Costar Cat # 3904）中に播種した。各アッセイでは、1 つのプレートを「0 日目」のプレートと称し、これらのプレートの各ウェルに、希釈培地をさらに $10 \mu\text{l}$ 、続いて $80 \mu\text{l}$ /ウェルの Cell titrer Glo（登録商標）試薬（Promega # G7573）を添加した。アッセイプレートを 10 分間、穏やかに振とうして、得られた発光強度を、Perkin Elmer EnVision（登録商標）2101 プレートリーダーを使用して測定した。各抗体に関して、希釈培地中の 10 倍溶液として、段階希釈物を調製し、適切なウェルに $10 \mu\text{l}$ を添加した。試験抗体に加えて、FGF1（Peprotech、Cat # 100-17A、最終アッセイ濃度 0~30 nM）、市販の抗 FGFR2 抗体（R&D systems、Cat # MAB6841）および非 FGFR2 結合抗体が対照試薬として含まれ

た。アッセイプレートは、5%CO₂で37℃で3日間インキュベートした。このインキュベーション後、プレートをおよそ30分間室温にして、80μl/ウェルのCell titer Glo（登録商標）試薬（Promega #G7573）を添加した。次に、プレートを10分間、穏やかに振とうして、得られた発光強度を、Perkin Elmer EnVision（登録商標）2101プレートリーダーを使用して測定した。細胞増殖に対する抗体の効果を決定するために、未加工発光値を反復に関して平均化して、0日目の対照と比較した。10846、11725および12439は、これらの研究では評価されなかったが、試験した他の抗体はいずれも、FGF1を置換して、細胞成長を維持することが可能であった。データの概要を図2（A）／（B）に示す。

【0349】

同様に、Baf細胞系を使用して、抗体の、FGFR2受容体シグナル伝達のアнтаゴニストとして作用する潜在性を評価した。これらの研究では、上記アゴニズム研究に記載されるように、希釈培地への30μg/mlのFGF1（PeproTech、Cat #100-17A）の添加を伴って、Baf-FGFR2細胞を平板培養した。各抗体に関して、30μg/mlのFGF1を有する希釈培地中の4倍溶液として、段階希釈物を調製し、適切なウェルに25μlを添加した。試験抗体に加えて、市販の抗FGFR2抗体（R&D systems、Cat #MAB6841）および非FGFR2結合抗体が対照試薬として含まれた。アッセイプレートは、5%CO₂で37℃で3日間インキュベートした。このインキュベーション後、プレートをおよそ30分間室温にして、80μl/ウェルのCell titer Glo（登録商標）試薬（Promega #G7573）を添加した。次に、プレートを10分間、穏やかに振とうして、得られた発光強度を、Perkin Elmer EnVision（登録商標）2101プレートリーダーを使用して測定した。相対的な細胞増殖に対する抗体の効果を決定するために、未加工発光値を反復に関して平均化して、比較した。10846、11725および12439は、これらの研究では評価されなかった。試験した他の抗体の効果は、図3（A）／（B）に示され、評価したクローンのうち、10918、10923、12931、12944、12947および12422が、100nM未満の濃度で、50%よりも上回って、操作Baf細胞の増殖を阻害したことを実証する。

【0350】

実施例4：ADCの調製

1ステッププロセスによるDM1コンジュゲートの調製

抗体12425を、コンジュゲーション反応を開始する前に接線流濾過（TFF#1）により反応バッファー（15mMリン酸カリウム、2mM EDTA、pH7.6）中で透析濾過した。続いて、抗体12425（5.0mg/mL）をDM1（抗体量に対して5.6倍モル過剰）、次いで、SMCC（抗体量に対して4.7倍過剰）と混合した。反応を、2mM EDTAおよび10%DMAを含有する15mMリン酸カリウムバッファー（pH7.6）中、20℃で約16時間行った。1M酢酸を添加してpHを5.50に調整することにより反応をクエンチした。pH調整後、反応混合物を多層（0.45/0.22μm）PVDFフィルターを通して濾過し、精製し、接線流濾過（TFF#2）を使用して8.22%スクロースを含有する20mMコハク酸バッファー（pH5.0）中で透析濾過した。接線流濾過のための装置パラメーターを、以下の表5に列挙する。

【0351】

10

20

30

40

【表 5】

表 5. 接線流濾過に関する装置パラメータ

TFF パラメータ	TFF#1設定点	TFF#2設定点
バルク濃度(Cb - g/L)	20	20
TMP (psi)	12-18	12-18
供給流速(LMH)	324	324
膜負荷(g/m ²)	110 - 150	110 - 150
透析容量	10	14
透析濾過バッファー	15 mM リン酸カリウム, 2 mM EDTA, pH 7.6	20 mM コハク酸塩, 8.22% スクロース, pH 5.0
温度(°C)	RT (20 - 25)	RT (20 - 25)

10

【0352】

上記のプロセスから得られたコンジュゲートを、細胞毒性剤ローディング（メイタンシノイドと抗体の比、MAR）についてはUV分光法；コンジュゲート単量体の決定についてはSEC-HPLC；および遊離メイタンシノイドパーセンテージについては逆相HPLCまたは疎水性保護相（Hisep）-HPLCにより分析した。データは表6に示す。

【0353】

【表 6】

表 6. 12425-MCC-DM1 の特性

試料	MAR	単量体 (%)	総遊離メイタンシノイド (%)
12425-MCC-DM1	3.6	98.0	1.0

20

【0354】

原位置でのプロセスによりDM1コンジュゲートの調製

本発明のコンジュゲートはまた、下記手順に従って、原位置でのプロセスにより調製することができる。抗体（21個のクローン）は、スルホサクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（スルホ-SMCC）リンカーを使用してDM1にコンジュゲートされた。DM1およびスルホ-SMCCヘテロ二官能性リンカーのストック溶液を、DMA中で調製した。スルホ-SMCCとDM1チオールとを一緒に混合して、40% v/vの水性50 mMコハク酸バッファー、2 mM EDTA、pH 5.0を含有するDMA中で、DM1とリンカーとの比1.3:1モル当量およびDM1の最終濃度1.95 mMで、25°Cで10分間反応させた。次いで、抗体を反応のアリコートと反応させて、50 mM EPPS、pH 8.0および10% DMA（v/v）中、2.5 mg/mLのAbの最終コンジュゲーション条件下で、約6.5:1のSMCCとAbとのモル当量比を得た。25°Cで約18時間後、コンジュゲーション反応混合物を、10 mMコハク酸塩、250 mMグリシン、0.5% スクロース、0.01% Tween 20、pH 5.5で平衡化させたSEPHADEX（商標）G25カラムを使用して精製した。

30

40

【0355】

【表 7】

表 7. DM1-コンジュゲート化抗体の特性

クローン 名称	リンカー 過剰	MAR	モノマー (%)	収率 (%)	遊離薬物 (%)
10164	6.8	3.5	98	88	<0.5
10220	7.5	3.55	98	96	0.5
10553	6.4	3.7	100	64	<0.5
10554	6.3	3.5	100	79	<0.5
10846	6.3	3.4	99	71	<0.5
10918	6.4	3.6	98	99	0.5
10923	6.2	3.5	100	95	0.7
10925	7.9	3.5	99	70	<0.5
11722	9.5	3.5	99	84	3.7
11723	7.3	3.3	99	64	<0.5
11725	8.2	3.4	99	74	<0.5
11729	9.5	3.2	93	30	0.7
12422	6.2	4.0	99	60	<0.5
12425	6.1	3.5	99	70	<0.5
12433	6.1	3.4	99	82	<0.5
12435	7.0	3.4	99	75	<0.5
12438	7.7	3.4	99	75	<0.5
12439	6.4	3.5	99	99	0.5
12931	6.4	3.8	99	80	0.5
12944	7.8	3.5	99	38	1.6
12947	6.7	3.8	99	99	<0.5

S P D B リンカーを使用する A D C の調製

抗体 1 2 4 2 2、1 2 4 2 5 および 1 2 4 3 3 (8 mg/ml) を、50 mM NaCl、2 mM EDTA、および 5% DMA を含有する 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5) 中、25℃で 120 分間、N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B、それぞれ、5.0、5.5 および 4.9 倍モル過剰) を使用して改変した。次いで、精製されていない改変 Ab を、50 mM NaCl、2 mM EDTA、および 5% DMA を含有する 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5) 中、4 mg/mL の最終改変抗体濃度で、25℃で 18 時間、DM4 (未結合のリンカーに対して 1.7 倍モル過剰) にコンジュゲートした。コンジュゲーション反応混合物を、10 mM コハク酸塩、250 mM グリシン、0.5% スクロース、0.01% Tween 20、pH 5.5 で平衡化および溶出させる S E P H A D E X (商標) G 2 5 カラムを使用して精製した。

【0357】

【表 8】

表 8. DM4 とコンジュゲートされた抗体の特性

クローン 名称	リンカー 過剰	MAR	モノマー (%)	収率 (%)	遊離薬物 (%)
12422	5.0	3.6	99	85	0.5
12425	5.5	3.6	98	>90	<0.5
12433	4.9	4.0	99	75	0.5

【0358】

C X 1-1 リンカーを使用する A D C の調製

抗体 1 2 4 2 5 (5.0 mg/mL) を、DM1 (抗体量に対して 7.15 倍モル過剰)、次いで、C X 1-1 (抗体量に対して 5.5 倍過剰) と混合した。反応を、2 mM EDTA および 5% DMA を含有する 60 mM E P P S [4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸] バッファー (pH 8.5) 中、25℃で約 16 時間行った。次いで、反応混合物を、10 mM コハク酸塩、250 mM グリシン、0.5% スクロース、0.01% Tween 20、pH 5.5 中で平衡化および溶出させる S E P H A D E X (商標) G 2 5 カラムを使用して精製した。

【0359】

【表 9】

表 9. CX1-1/DM1 とコンジュゲートされた 12425 の特性

クローン 名称	リンカー 過剰	MAR	モノマー (%)	収率 (%)	遊離薬物 (%)
12425	5.5 X	3.4	97	>90	0.1

【0360】

実施例 5: 親抗体と比較した A D C の親和性

S M C C-DM1 にコンジュゲーション後の F G F R 2 および F G F R 4 に対する抗体の親和性を、上記の実施例 2 に記載のものと同様の方法を使用して、B i a c o r e (登録商標) T 1 0 0 装置 (G E S y s t e m s) および C M 5 センサーチップを使用する

B i a c o r e（登録商標）技術を使用して決定した。

【 0 3 6 1 】

評価した抗体に関して、親非コンジュゲート化抗体と比較して S M C C - D M 1 コンジュゲート化抗体について、ヒト F G F R 2 I I I b への結合に関して類似する親和性推定値が得られたが、これはコンジュゲーションが抗体結合に感知できるほど影響しないことを示唆している（表 1 0）。

【 0 3 6 2 】

【表 1 0】

表 10. コンジュゲートされていない抗体およびSMCC-DM1とコンジュゲートされた抗体に関する親和性推定値

10

抗体 ID	ヒト FGFR2 IIIb 親和性 (K_D) (nM)	
	コンジュゲートされていない抗体	抗体 -MCC-DM1
10164	2	2.6
10220	17	7.8
10846	3.5	3.8
10918	2.2	2.1
10923	2.2	2.3
11722	4.3	8.8
11723	6.6	5.9
11725	3.3	2.9
12422	5.1	N.D.
12425	2.1	2.3
12433	5.6	4.9
12439	15	N.D.
12931	3.4	N.D.
12944	9.4	N.D.
12947	2.7	N.D.

20

30

N.D. = 決定せず

【 0 3 6 3 】

さらに、幾つかの S M C C - D M 1 とコンジュゲートされた抗体の F G F R 2 および F G F R 4 種オルソログに対する親和性を決定した。これらの研究では、親和性における感知可能な差は、コンジュゲートされた抗体とコンジュゲートされていない抗体との間では見られなかった（表 1 1）。

40

【 0 3 6 4 】

【表 1 1】

表 11. FGFR2およびFGFR4種オルソログに対するSMCC-DM1とコンジュゲートされた抗体の親和性

	親和性 (K _D) (nM)					
タンパク質	12433	12433-MCC-DM1	10164	10164-MCC-DM1	12425	12425-MCC-DM1
ヒト FGFR 2IIIb	5.6	4.9	2	2.6	2.1	2.3
マウス FGFR2 IIIb	2.2	1.2	10	10	3.2	3.6
ラットFGFR2 IIIb	3.7	2.8	2.8	3.5	3.1	3.5
カニクイザル FGFR2 IIIb	1.7	1.5	9	3.8	1.6	1.9
ヒト FGFR4	結合なし	N.D.	結合なし	N.D.	4.0	4.6
マウス FGFR4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.6	2.2
ラットFGFR4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.2	4.2
カニクイザル FGFR4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.3	2.1

N.D. = 決定せず

【0365】

実施例 6 : SNU16 および Kato-III 細胞における ADC の *in vitro* 活性

SMCC-DM1 リンカー-ペイロードへのコンジュゲーション後に、抗体薬物コンジュゲート (ADC) の、FGFR2 増幅細胞株 SNU16 (ATCC Cat # CRL-5974) および Kato-III (ATCC Cat # HTB-103) の増殖を阻害する能力を決定した。簡潔に述べると、供給業者により推奨されるように、細胞を組織培養インキュベーター中で 5% CO₂ で 37℃ で培養培地中で培養した。アッセイの当日に、細胞を PBS (Lonza Cat # 17516C) で 2 度洗浄した後、0.25% トリプシン-EDTA (Gibco (登録商標) Cat # 25300) で 5 分間処置して、推奨される培養培地中に再懸濁した。次に、細胞を計数して、細胞培養培地 100 μl 中に 2600~3600 個の細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレート (Costar Cat # 3940 または Corning (登録商標) Cat # 3340) 中に播種した。二重反復プレートは、0 日目の測定用に生成されて、全てのプレートを組織培養インキュベーター中で 5% CO₂ で 37℃ で一晩インキュベートした。また、培地のみのウェルを生

成して、陰性対照として作用させた。このインキュベーション後、 $50\ \mu\text{l}$ ／ウェルの Cell titer Glo（登録商標）試薬（Promega #G7573）を、0日目プレートに添加して、次にそれらを10分間、穏やかに振とうして、得られた発光強度を、Perkin Elmer EnVision（登録商標）2101プレートリーダーを使用して測定した。試験ADCは、適切な細胞培養培地中、 $2\times$ ストック溶液へ二重反復で段階希釈して、アッセイプレートの残部それぞれから培地 $50\ \mu\text{l}$ を除去した後、 $2\times$ 段階希釈ADC $50\ \mu\text{l}$ を添加した（最終アッセイ濃度 $0.2\sim 50\ \text{nM}$ DM1等価体）後、組織培養インキュベーター中で $5\%\ \text{CO}_2$ で 37°C で5日間インキュベートした。このインキュベーション期間後に、相対細胞生存率を、上述するようにCell titer Glo（登録商標）試薬の添加により決定した。細胞増殖に対するADCの

10

効果は、下記の通りに二重反復の平均値を使用して算出された：
阻害% = (処置ADC - 未処置) / (未処置 - 0日目) $\times 100$

【0366】

阻害%データを4パラメーターロジスティック方程式にフィッティングさせて、 IC_{50} 値を決定した。IgG対照ADCと異なり、試験ADCは、 $3\ \text{nM}$ 未満の IC_{50} で、Kato-I IIおよびSNU16細胞の両方の増殖の強力な阻害剤であることがわかった。（表12）。

【0367】

【表 1 2】

表 12. MCC-DM1 ADC としての抗体効力

抗体 ID	細胞増殖 IC50 (nM)	
	Kato-III	SNU16
10164	1.6	0.5
10220	0.33	<0.2
10846	0.43	<0.2
10918	0.61	<0.2
10923	0.45	<0.2
11722	0.59	<0.2
11723	0.91	<0.2
11725	5.2	5
12422	< 3	< 3
12425	0.15	< 0.2
12433	< 3	< 3
12439	< 3	< 3
12931	< 3	< 3
12944	< 3	< 3
12947	< 3	< 3
IgG 対照 ADC	>50	>25

10

20

30

【0368】

また、SPDB-DM4 リンカー-ペイロードを介してコンジュゲートされた幾つかの抗FGFR抗体の能力を評価した。上述するように実施したこれらの研究により、評価した抗体はまた、SPDB-DM4 ADCとして細胞増殖の強力な阻害剤であることが明らかとなり、ペイロードを首尾よく送達して、細胞を死滅させるそれらの能力は、MCC-DM1に限定されないことを示唆した。SNU16細胞株に関するデータを表13に概要する。

40

【0369】

【表 13】

表 13. SPDB-DM4 ADC としての抗体効力

抗体 ID	細胞増殖 IC50 (nM)
12422	0.07
12425	0.04
12433	0.8
IgG 対照 ADC	>25

10

【0370】

実施例7： 抗FGFR2/4 ADCのin vivo活性の評価

15個の抗FGFR2または抗FGFR2/FGFR4交差反応性ADCの抗腫瘍活性は、胃のFGFR2増幅(CN=31)、FGFR2 I I I bアイソフォーム発現性SNU16異種移植片腫瘍モデルで評価した。2つの独立した研究において、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel(商標)(BD Biosciences)を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。マウスは、平均腫瘍体積192.9mm³による移植の8日後に、第1の研究に加えた。9つの群(n=8匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBSまたは下記抗体薬物コンジュゲート：12433-MCC-DM1、10164-MCC-DM1、10220-MCC-DM1、10918-MCC-DM1、10923-MCC-DM1、11722-MCC-DM1、12422-MCC-DM1または12425-MCC-DM1の1つの単回3mg/kg静脈内(i.v.)注射を投与した。マウスは、平均腫瘍体積223.4mm³による移植の7日後に、第2の研究に加えた。9つの群(n=8匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBSまたは下記抗体薬物コンジュゲート：12433-MCC-DM1、12947-MCC-DM1、12931-MCC-DM1、12944-MCC-DM1、12439-MCC-DM1、10846-MCC-DM1、11725-MCC-DM1または11723-MCC-DM1の1つの3mg/kgのi.v.注射を投与した。12433-MCC-DM1は、両方の研究における抗体薬物コンジュゲートの直接的な比較を容易とするために、2つの研究間の懸け橋として含まれた。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した。これらの研究で評価されるADCは、投与の23から24日後に広範囲の抗腫瘍活性を示した(33.2%T/Cから77.8%退縮に及ぶ)(図4(A)および図4(B))。

20

30

【0371】

切断性ジスルフィドリンカーに基づくSPDB-DM4 FGFR2 ADCの抗腫瘍活性を、SNU16異種移植片腫瘍モデルで評価した。これらの研究では、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel(商標)(BD Biosciences)を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。マウスは、平均腫瘍体積223mm³による移植の11日後に、研究に加えた。5つの群(n=7匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBS(10ml/kg)、12433-MCC-DM1もしくは対照IgG-MCC-DM1の単回15mg/kg静脈内注射、または12433-SPDB-DM4もしくはIgG-SPDB-DM4の単回5mg/kg静脈内注射を投与した。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した。対照ADCはいずれも、この研究では抗腫瘍活性を示さなかった(図4(C))。しかしながら、

40

50

対照的に、12433-MCC-DM1および12433-SPDB-DM4はともに、投与した用量で、SNU16異種移植片モデルに対して高活性であり、抗FGFR ADCの抗腫瘍効果が、異なるリンカーを用いて得られ得ることを示唆した。

【0372】

抗FGFR ADCの薬物動態(PK)を、3mg/kgの単回IV投与後にSNU16腫瘍保有マウスで評価した。PK試料は、投与の1時間後、24時間後、72時間後、168時間後、および336時間後に収集した。全ての研究において、「総」抗体および「抗体薬物コンジュゲート(ADC)」の両方の血清濃度は、確証されたELISA法を使用して全ての動物種で測定された。「総」分画は、コンジュゲートされたDM1を伴うか、または伴わない抗体の測定を指すのに対して、ADC分画は、DM1とコンジュゲートされた抗体のみの測定を指す(1つ以上のDM1分子)。全ての研究において、感知可能な差は、ADCと総抗体分画とのクリアランス間で観察されなかった。ADCのPK特性の概要を図4(D)~図4(E)に示す。SNU16腫瘍保有マウスにおける単回3mg/kg投与後のADCクリアランスを、観察される抗腫瘍効果と比較した場合、最大の抗腫瘍活性を有するADC(40%を上回る腫瘍退縮)は全て、45ml/d/kg未満の速度で除去されることがわかった(図4(F))。

【0373】

実施例8: FGFR2増幅細胞株を使用した*in vitro*でのコンジュゲートされていない抗体およびコンジュゲートされた抗体のシグナル伝達活性の評価

コンジュゲートされていない抗FGFR2抗体およびSMCC-DM1とコンジュゲートされた抗FGFR2抗体の、FGFR2増幅細胞株においてFGFRシグナル伝達を調節する能力を評価した。初期研究では、SNU16(ATCC Cat#CRL-5974)細胞における12433、12425および10164抗体の効果を決定した。簡潔に述べると、細胞を12ウェルCell Bind(商標)プレート(Costar Cat#3336)において10%FBSを補充したRPMI中に播種して、組織培養インキュベーター中で5%CO₂で37℃で一晩インキュベートした。実験の当日に、細胞培養培地を吸引して、試験抗体または小分子FGFR阻害剤BGJ398のいずれかで置き換えて、全てを、(13~130nM、抗体/ADC、500nM、BGJ398)の最終濃度で、10%FBSを補充したRPMI中で希釈した。次に、細胞を組織培養インキュベーター中で5%CO₂で37℃で2時間インキュベートした。このインキュベーション後、細胞を冷PBS(Lonza、Cat#17516C)で2度洗浄して、氷上に置いて、PhosphoSTOP(Roche Cat#04906237001)とともに溶解緩衝液(CST Cat#9803)300μlを添加した。タンパク質濃度は、BCAアッセイ(Pierce Cat#23228)により決定した。続いて、タンパク質60μgをSDS-PAGEにより分離させて、ニトロセルロース膜上へ転写して、pFRS2(Cell Signaling Technology、Cat#3861)、総FGFR2(例えば、Santa Cruz Biotechnology、Cat#SC-122またはR&D systems Cat#6841)およびβ-アクチン(Bethyl、Cat#A300-485A)またはサイトケラチン(Dako Cat#M3515)に対する抗体でプローブした。結果を図5(A)に示し、コンジュゲートされていないか、またはMCC-DM1 ADCとしてのいずれの抗体も、2時間でpFRS2シグナルを調節することが不可能であることがわかった。12425抗体(4.3nM)および12425-MCC-DM1 ADC(4.3nM抗体、13nM DM1等価体)を用いてさらなる実験を行い、ここではSNU16および同様にKato-I II(ATCC Cat#HTB-103)細胞の両方においてさらなる時点(4時間、24時間および72時間)を評価した。結果を図5(B)(SNU16)および図5(C)(Kato-I II)に示す。ネイキッド抗体またはADCのいずれの効果も、SNU16細胞においては48時間まで、またはKato-I II細胞においては72時間まで観察されなかった。pFRS2およびtFGFR2シグナルの両方の低減が、12425-MCC-DM1処置後にサイトケラチンに対してSNU16細胞において72時間に観

10

20

30

40

50

察された。以下の実施例 9 に記載されるように、12425-MCC-DM1 は、72 時間の時点での SNU16 増殖の強力な阻害剤であり、この減少は、SNU16 細胞集団において FGFR2 発現の不均一性を反映する可能性が高い。

【0374】

実施例 9：細胞増殖に対する ADC およびコンジュゲートされていない抗体の評価

コンジュゲートされていない抗 FGFR 抗体および SMCC-DM1 とコンジュゲートされた抗 FGFR 抗体の、FGFR2 増幅過剰発現性およびヌル細胞株パネルの増殖を阻害する能力を評価した。これらの研究では、供給業者により推奨されるように、細胞を組織培養インキュベーター中で 5% CO₂ で 37℃ で培養培地中で培養した。アッセイの当日に、細胞を PBS (Lonza Cat # 17516C) で 2 度洗浄した後、0.25% トリプシン-EDTA (Gibco (登録商標) Cat # 25300) で 5 分間処置して、推奨される培養培地中に再懸濁した。次に、細胞を計数して、細胞培養培地 55~100 μl 中に 800~3600 個の細胞/ウェルの密度で 96 または 384 ウェルプレート (例えば、Costar Cat # 3940、Corning (登録商標) Cat # 3340、Costar Cat # 3707) 中に播種した。二重反復プレートは、0 日目の測定用に生成されて、全てのプレートを組織培養中で 5% CO₂ で 37℃ で一晩インキュベートした。また、培地のみのウェルを生成して、陰性対照として作用させた。このインキュベーション後、30~50 μl/ウェルの Cell titer Glo (登録商標) 試薬 (Promega # G7573) を、0 日目プレートに添加して、次にそれらを 10 分間、穏やかに振とうして、得られた発光強度を、Perkin Elmer En Vision (登録商標) 2101 プレートリーダーを使用して測定した。試験 ADC は、適切な細胞培養培地中、2×または 10×ストック溶液のいずれかへ二重反復で段階希釈した。2×ADC ストック溶液が使用されるアッセイに関しては、アッセイ培地の半分を除去して、等量の 2×段階希釈 ADC で置き換えた。10×ADC ストック溶液が用いられた場合、これを、アッセイプレートへ 1:10 で希釈した (例えば、5 μl 対 55 μl) 後、組織培養インキュベーター中で 5% CO₂ で 37℃ で 5 日間または 6 日間インキュベートした。ADC の最終的なアッセイ濃度は、0.005~100 nM DM1 等価体の範囲であった。このインキュベーション期間後に、相対細胞生存率を、上述するように Cell titer Glo (登録商標) 試薬の添加により決定した。細胞増殖に対する ADC の効果は、下記の通りに二重反復の平均値を使用して算出された：

阻害% = (処置 ADC - 未処置) / (未処置 - 0 日目) × 100

【0375】

阻害% データを 4 パラメーターロジスティック方程式にフィッティングさせて、IC₅₀ 値を決定した。12425-MCC-DM1 に関する代表的なデータを図 6 (A) に示す。この ADC は、SNU16 (図 6 (A)) および Kato-I II FGFR2 増幅細胞株 (図 6 (B)) の両方において細胞増殖の強力な阻害剤であることがわかった。これらの細胞株はともに、メイタンシノイドペイロードに対して感受性があることが確認された (L-Me-DM1、図 6 (A)~図 6 (C) では遊離 DM1) が、類似のメイタンシノイド抗体比で SMCC-DM1 を介してコンジュゲートされた非ターゲティング ADC (ニワトリリゾチームに対して) に対して感受性がないことが確認された。12425-MCC-DM1 はまた、感知可能な FGFR2 発現を欠如しているが、メイタンシノイドペイロードに対して感受性がある胃がん細胞株 NUGC3 に対して活性がなかった (図 6 (C))。さらに、コンジュゲートされていない抗体 12425 は、SNU16 (図 6 (D)) および Kato-I II (データは示していない) の両方において抗増殖活性を欠如することがわかった。SNU16、Kato-I II、SUM-52、MFM223 および H716 細胞 (Kunii et al., 2008 Cancer Res 68: 2340-2348、Turner et al., 2010 29: 2013-2023、Mathur et al., 2010. Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, poster # 284) を含む FGFR2 増幅細胞株における幾つかの抗 FGFR-MCC-DM1 ADC の抗増殖活性の概要を表 14 に示す。さらに、ADC はいずれも、AZ521、CAL-51、KYSE-150

、TE-6、SNU-1041、TT、CHL-1、G401およびHEC59を含む腫瘍細胞株パネルに対して活性であることがわかった。

【0376】

【表14】

表 14. FGFR2 遺伝子増幅細胞株および非増幅細胞株における幾つかの抗 FGFR-MCC-DM1 ADC の抗増殖活性

細胞株	系列	FGFR2 増幅? (アイソフォーム)	In vitro 効力 (IC ₅₀ , nM 遊離 DM1 等価体)			
			12433-DM1	10164-DM1	12425-DM1	IgG-DM1
SNU16	胃	あり (IIIb)	0.08	0.04	0.03	11
Kato-III	胃	あり (IIIb)	0.28	0.32	0.34	30
SUM-52	胸	あり (IIIb)	0.29	0.14	0.17	>30
MFM223	胸	あり (IIIb)	24	3.5	1	>30
H716	結腸	あり (IIIc)	>30	1.7	0.1-0.7	>30
NUGC3	胃	なし (IIIb)	>30	>30	>30	>30

【0377】

実施例 10: FGFR ADC の in vivo PK-PD

12425-MCC-DM1 の、in vivo で薬物動態マーカーを調節する能力を評価するために研究を行った。この研究の目標は、FGFR2 または FGFR4 発現と G2/M 細胞周期停止との間の関連性を評価することであった。免疫組織化学により評価されるように、pHH3 陽性核の蓄積は、G2/M 停止のマーカーとして使用した。

【0378】

ヒトヒストン H3 の Ser10 周囲の残基に相当する合成ホスホペプチドで動物を免疫化することにより生産されるウサギポリクローナル抗体は、Cell Signaling Technology (ダンバーズ、MA) から入手した。簡潔に述べると、IHC プロトコールは、熱、および Ventana Cell Conditioning #1 抗原回復 (antigen retrieval) 試薬に対する標準的な曝露を含んでいた。一次抗体を 1 : 100 に希釈して、37℃で60分間インキュベートした。続いて、Ventana OmniMap で予め希釈した HRP とコンジュゲートした抗ラビット抗体 (Cat # 760-4311) とのインキュベーションを4分間実施した。

【0379】

FGFR2 増幅 SNU16 異種移植片モデルにおいて PD を評価するために、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に 50% フェノールレッドフリー Matrigel (商標) (BD Biosciences) を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は $200 \mu\text{l}$ であった。腫瘍がいったん $300 \sim 500 \text{ mm}^3$ に達したら、6匹のマウスを無作為に割り当てて、i.v. 用量の 12425-MCC-DM1 (10 mg/kg) または PBS (10 ml/kg) を

受けさせた ($n = 3$ 匹/群)。メイタンシノイドペイロードの予測される作用機序と一致して、12425-MCC-DM1は、PBS処置対照と比較して、投与の24時間後に核pHH3陽性の顕著な時間依存的増加をもたらした(代表的な画像を図7(A)に示す)。切断されたカスパーゼ3における時間依存的変化もまた評価した。これらの研究では、ヒトカスパーゼ3における(Asp175)に隣接するアミノ末端残基に相当する合成ペプチドで動物を免疫化することにより生産されるウサギポリクローナル抗体は、Cell Signaling Technology(ダンバーズ、MA)から入手した。IHCプロトコルは、熱を含まず、Ventana Cell Conditioning #1抗原回復試薬に対する標準的な曝露を含んでいた。一次抗体を1:300に希釈して、室温で60分間インキュベートした。続いて、Ventana OmniMapで

10

予め希釈したHRPとコンジュゲートした抗ラビット抗体(Cat #760-4311)とのインキュベーションを4分間実施した。pHH3と類似して、同様に、切断されたカスパーゼ3における時間依存的変化が観察された(図7(A))。類似したデータが、他の抗FGFR2 ADC、例えば12433-MCC-DM1に関しても得られた。

【0380】

ADC特異性を評価するために、PDは、FGFR2/FGFR4陰性NUGC3異種移植片モデルにおいて評価した。これらの研究では、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel(商標)(BD Biosciences)を含有する懸濁液中で、 1×10^6 個の細胞を皮下注射した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。腫瘍がいったん300~500 mm³に達したら、9匹のマウスを無作為に割り当てて、単回静脈内15 mg/kg用量の12425-MCC-DM1、対照IgG-MCC-DM1またはPBS(10 ml/kg)を受けさせた($n = 3$ 匹/群)。12425-MCC-DM1は、FGFR2およびFGFR4陰性NUGC3異種移植片において、15 mg/kg i.v. 用量の対照IgG-MCC-DM1に対してpHH3レベルを調節することができなかった(代表的な画像を図7(B)に示す)。類似したデータが、他の抗FGFR2 ADC、例えば12433-MCC-DM1に関しても得られた。

20

【0381】

まとめると、これらのデータは、12425-MCC-DM1が、FGFR2またはFGFR4発現に依存して、またメイタンシノイドペイロードの作用機序と一致する頑強な

30

in vivoでの細胞PD効果を誘発することが可能であることを実証している。

【0382】

実施例11: 抗FGFR ADCのin vivo有効性

抗FGFR2および/または抗FGFR2/4 ADCの抗腫瘍活性を、幾つかの腫瘍異種移植片モデルで評価した。

【0383】

FGFR2ゲノム増幅による異種移植片モデル

モデル1: 3つの抗FGFR2または抗FGFR2/FGFR4二重ターゲッティングADCの抗腫瘍活性を、胃のFGFR2増幅(コピー数=31、SNP6.0)、FGFR2 IIIcアイソフォーム発現性NCI-H716結腸直腸異種移植片腫瘍モデルで

40

評価した。雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel(商標)(BD Biosciences)を含有する 5×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。

【0384】

マウスは、平均腫瘍体積171.7 mm³による移植の4日後に、研究に加えた(図8(A))。8つの群($n = 6$ 匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBS(10 mg/kg)または単回i.v. 用量の対照IgG-MCC-DM1(15 mg/kg)、12422-MCC-DM1(5または15 mg/kg)、12425-MCC-DM1(5または15 mg/kg)または10164-MCC-DM1(5または15 mg/kg)を投与した。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した。対照IgG

50

—MCC—DM1は、15mg/kgでは活性ではなかった。10164—MCC—DM1は、5mg/kgでは活性ではなかった。10164—MCC—DM1（15mg/kg）、12422—MCC—DM1（5および15mg/kg）および12425—MCC—DM1（5および15mg/kg）は、投与後の14日まで類似した活性を示した。12425—MCC—DM1（5mg/kgおよび15mg/kg）および10164—MCC—DM1（15mg/kgのみ）は、投与後の18日まで最も持続性の応答をもたらした（それぞれ、23%、21%および31% T/C）。

【0385】

モデル2：3つの抗FGFR2または抗FGFR2/FGFR4 ADCの用量応答抗腫瘍活性はまた、FGFR2増幅、FGFR2 IIIbアイソフォーム発現性MFM223 ER/PR/Her2陰性胸部異種移植片腫瘍モデルで評価した。MFM223モデルは、断片に基づくモデルとして樹立された。断片移植の1日前に、雌ヌードマウスに、血清エストロゲンレベルを維持するための60日持続放出17β-エストラジオールペレット（Innovative Research of America）0.72mgを皮下移植した。17β-エストラジオールペレット移植の1日後、ドナーマウスから収集した異種移植片を、レシピエントヌード雌マウスへ皮下移植される3mm³断片ごとに3つに切断した。マウスは、平均腫瘍体積208.4mm³による移植の21日後に、研究に加えた（図8（B））。5つの群（n=8匹/群）のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBS（10mg/kg）または単回10mg/kg i.v. 用量の対照IgG—MCC—DM1、12433—MCC—DM1、10164—MCC—DM1または12425—MCC—DM1を投与した。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した。IgG—MCC—DM1は、このモデルでは活性ではなかった。単回10mg/kg i.v. 用量の12433—MCC—DM1、12425—MCC—DM1および10164—DM1は、投与の18日後に、37%、24%および7% T/Cをもたらした。

【0386】

モデル3：単剤としての12425—MCC—DM1の活性はまた、FGFR2増幅患者由来原発性胃腫瘍異種移植片モデルCHGA-010（FGFR2コピー数=48、（SNP6.0））で評価した。これらの研究では、雌nu/nu無胸腺マウスに、DME M中に50%フェノールレッドフリーMatrigel（商標）（BD Biosciences）を含有する3×3×3mm腫瘍断片を皮下移植した。腫瘍生着率は50%を上回り、移植の4週後にはおよそ250mm³に達した。10mg/kg IV 12425—MCC—DM1の単回投与後に、腫瘍停滞は、投与後のおよそ16～20日まで達成された（図8（C））。類似した単回投与データが、FGFR2特異的ADC、12433—MCC—DM1に関しても得られた（データは示していない）。さらに、10mg/kgのq3w*2 IVを受けた群は、およそ腫瘍停滞を初期投与後の37日まで維持した一方で、単回10mg/kg用量を受けた群での腫瘍は、初期投与後の37日までに平均して1588mm³となった。これらのデータは、CHGA010異種移植片が、12425—MCC—DM1の第2の投与に応答することが可能であることを実証している。

【0387】

正常なFGFR2および/またはFGFR4コピー数を有する異種移植片モデル

12425—MCC—DM1の抗腫瘍活性はまた、正常なFGFR2コピー数および様々なFGFR2およびFGFR4 mRNA発現を有する23個のヒト肺原発性腫瘍異種移植片、および22個のヒト胸部原発性腫瘍異種移植片で評価した。ヒト原発性異種移植片モデルは、ヒト肺原発性腫瘍断片を、雌ヌードマウスへ皮下移植することにより樹立した。得られた腫瘍異種移植片を、雌ヌードマウスへの3mm³断片の皮下移植により、in vivoで継代培養した（passaged）。動物に腫瘍断片を移植して、随時登録（rolling enrollment）により、即ち腫瘍がいったんおよそ250mm³に達したが必ずしも腫瘍断片移植後の同じ時間ではなしに、処置（未処置、または12425—MCC—DM1、15mg/kg i.v. q2w）に割り当てた。異種移植片モデル1つ当たり1匹の

10

20

30

40

50

動物が、2つの処置部門それぞれに割り当てられた。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定し、データは、腫瘍体積の変化パーセントとして解析した。

【0388】

23個の肺原発性腫瘍異種移植片モデルのうち8個、および22個の胸部原発性腫瘍異種移植片モデルのうち8個が、12425-MCC-DM1に応答した。応答は、一過性の腫瘍成長阻害から腫瘍移植片の完全退縮までに及んだ。12425-MCC-DM1に応答する1つの肺原発性腫瘍異種移植片モデルおよび1つの胸部原発性腫瘍異種移植片モデルの例は、それぞれ、図8(D)および図8(E)に示す。まとめると、データは、FGFR2またはFGFR4 mRNAのいずれかの発現の上昇を伴うヒト肺および胸部原発性腫瘍異種移植片の *in vivo* での成長が、12425-MCC-DM1処置により阻害され得ることを実証している。

10

【0389】

抗FGFR2/FGFR4 ADC 12425-MCC-DM1の用量応答抗腫瘍活性はまた、FGFR2を発現するが、遺伝子の正常なコピー数を有する胸部異種移植片モデルで評価した。モデルは、乳管癌を有する52歳女性由来の断片に基づく異種移植片モデルとして樹立され、雌ヌードマウスで展開させた。ドナーマウスから収集した異種移植片を、3mm³断片ごとに3つに切断して、血清エストロゲンレベルを維持して、異種移植片成長を支持するために0.0085mg/mlの17β-エストラジオールリッチな水を補充したレシピエントヌード雌マウスに皮下注射した。マウスは、平均腫瘍体積198mm³による移植の26日後に、研究に加えた。3つの群(n=6匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスに単回15mg/kg *i.v.* 用量の対照IgG-MCC-DM1、または15または5mg/kgでの単回 *i.v.* 用量の12425-MCC-DM1を投与した(図8(F))。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した。単回15mg/kg *i.v.* 用量の12425-MCC-DM1は、6.5%T/Cをもたらした一方で、5mg/kg用量は不活性であった。これらのデータは、遺伝子増幅なしでFGFR2発現性腫瘍における12425-MCC-DM1の有用性を支持する。

20

【0390】

まとめると、これらのモデルは、FGFR2遺伝子増幅の存在または非存在下で、細胞表面でFGFR2を発現する腫瘍における12425-MCC-DM1の有用性を支持する。

30

【0391】

実施例12： 小分子FGFR阻害剤BGJ398(3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素としても公知)によるFGFR ADCの抗腫瘍活性の改善

単独での、およびFGFR小分子チロシンキナーゼ阻害剤3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素(Guagnano et al., 2011 J Med Chem 54: 7066-7083)と組み合わせたFGFR2/4抗体薬物コンジュゲート12425-MCC-DM1の抗腫瘍活性は、FGFR2増幅CHGA119患者由来の原発性胃腫瘍異種移植片モデル(FGFR2コピー数=22(SNP6.0))で評価した。これらの研究では、2mm×2mm×2mmのサイズのCHGA119腫瘍断片を、雌nu/nu無胸腺マウスへ皮下(s.c.)移植した。移植の40日後、CHGA119腫瘍を保有するマウス(n=8、平均251mm³、範囲104~382mm³)を、それぞれ、経管栄養により経口的にビヒクル(酢酸/酢酸塩緩衝液中の50%PEG300)(pH4.6、10ml/kg、p.o.、q.d)で、対照IgG-3207-DM1(10mg/kg、*i.v.*、q2wk)で、12425-MCC-DM1(10mg/kg、*i.v.*、q2wk)で、3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素リン酸塩(10mg/kg、p.o.、q.d)で、

40

50

または12425-MCC-DM1および3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素リン酸塩の組合せで処置した。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した。単剤としての12425-MCC-DM1および3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素リン酸塩はそれぞれ、腫瘍停滞または部分的応答(それぞれ、T/C=4%または33%、 $p<0.05$)をもたらした一方で、12425-MCC-DM1および3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素リン酸塩の組合せでの処置は、処置の5週後に、ほぼ完全な腫瘍退縮を誘導した(退縮=-94%、 $p<0.05$) (図9および表15を参照)。10%未満の体重損失が、単剤または組合せ処置のいずれか後に観察された(表15)。これらのデータは、FGFR ADCをFGFRシグナル伝達の小分子阻害剤(例えば、3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-{6-[4-(4-エチルピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]}-ピリミジン-4-イル}-1-メチル尿素リン酸塩、TKI 258、ボナチニブ、AZD4547)と組み合わせることにより、抗腫瘍応答を改善させることができることを示唆する。

【0392】

【表15】

表 15. CHGA119 腫瘍保有マウスにおける腫瘍および宿主パラメーターに対する抗 FGFR 剤の効果

処置	腫瘍応答			宿主応答		
	T/C (%)	退縮(%)	平均(mean) 腫瘍体積の変化 (mm ³ ± SEM)	平均体重の変化 (g ± SEM)	体重の変化% (平均値 (Mean) ± SEM)	生存(生存動物/総計)
ビヒクル	100	-	1168±204	-1.3±0.3	-5.7±1.4	8/8
IgG-MCC-DM1	111	-	1301±243	-1.7±0.6	-7.6±2.7	8/8
12425-MCC-DM1	4	-	43±35	0.6±0.2	2.5±1.0	8/8
BGJ398 リン酸塩	33	-	386±169	-0.8±0.7	-3.7±3	8/8
12425-MCC-DM1+BGJ398	-	94	-223±32	-3.7±3.8	-4.3±3.8	7/8

【0393】

実施例 13: FGFR ADCのin vivo有効性に対する用量分割の効果

12425-MCC-DM1 C_{max} (ピーク曝露) またはC_{avg} (投薬間隔にわたる平均曝露) がその抗腫瘍活性において果たす役割をより良好に理解するために、SNU16 異種移植片モデルを使用して、時間用量分割実験を行った。固定された処置持続期間にわたって予測される固定された総曝露をもたらす広範囲の投与スケジュール間隔および用量レベルを研究した。ある特定の用量レベルで、FGFR2 ADCは、TMDDに起因して、非線形PKを示す(実施例19を参照)。したがって、全ての投与スケジュール間隔および用量レベルに対して固定された総曝露を維持するためには、PKモデリングにより、TMDDはより低用量でより顕著であるため、より低くより頻繁な投与スケジュールで投与される場合には、より多くの総用量の12425-MCC-DM1が必要とされることが予測された。PKモデリングにより、3 mg/kg q 3w*2、2.5 mg/kg q 2w*3、1.5 mg/kg q w*6 および0.7 mg/kg q 3d*1

4で投与した12425-MCC-DM1が、類似した総曝露を達成することが予測された。

【0394】

雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel（商標）（BD Biosciences）を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。マウスは、平均腫瘍体積181.7 mm^3 による移植の10日後に、第1の研究に加えた。

【0395】

PKパラメーターを評価するために、尾部の切れ目または後眼窩出血により、血清を収集して、ELISAによって解析した。総抗体PKアッセイは、比色ELISAによりDM1を伴って／伴わずに、総抗体濃度を測定する。プレートを抗ヒトIgG（Fc特異的）でコーティングして、検出は、ロバ抗ヒトIgG-HRPで行われ、その後適切なプレートリーダー上で読み取った。コンジュゲートPKアッセイは、非色ELISAにより少なくとも1つのDM1分子に結合されている抗体を測定する。この方式では、プレートを抗DM1抗体でコーティングして、ロバ抗ヒトIgG-HRPで検出する。血清は、初期投与後の下記時点で収集した：3 mg/kg q3w*2（2、6、24、48、96、168、240、336、503 h）、2.5 mg/kg q2w*3（2、6、24、48、96、168、240、335、503 h）、1.5 mg/kg qw*6（2、6、24、48、96、167、335、503、671、839 h）、0.7 mg/kg q3d*14（2、6、24、48、71、143、215、287、359、431、503、575、647、719、791、863、935 h）。

【0396】

5つの群（n=7匹／群）のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBS（10 mg/kg）または3 mg/kg q3w*2、2.5 mg/kg q2w*3、1.5 mg/kg qw*6または0.7 mg/kg q3d*14でi.v.投与される12425-MCC-DM1を投与した。予想通り、 C_{max} は、治療レジメンに対して多様であった一方で、 C_{avg} は変化がなかった（表16）。全ての治療レジメンが活性であり、類似した腫瘍成長阻害をもたらし、12425-MCC-DM1の平均曝露が、抗腫瘍活性の主要なドライバーであることを示唆した（図10）。これらの見解は、様々な投与スケジュールが、有効性を損なうことなく臨床で用いることができることを示す。

【0397】

【表16】

表 16. SNU16 腫瘍保有マウスへの、12425-MCC-DM1 の異なる用量およびスケジュールの投与後の PK パラメーター

投薬レジメン (Dosing Regimen)	総用量、 mg	<u>Cmax*, ug/ml</u> インタクト		<u>CavgTau, ug/ml</u> インタクト		Tau, h
		総計†	ADC‡	総計†	ADC‡	
3 mg/kg, iv, q3wx2	6	24.5	25.1	2.19	2.29	503
2.5 mg/kg, iv, q2wx3	7.5	21.2	21.6	2.59	2.30	335
1.5 mg/kg, iv, qwx6	9	11.0	11.0	2.56	2.50	167
0.72 mg/kg, iv, q3dx14	10	4.0	4.2	1.94	1.63	72

【0398】

実施例 14： in vitro および in vivo での ADCC 活性の評価

コンジュゲートされていない抗 FGFR2 抗体（12433、10164、12425、N297A__12425（ADCC 枯渇変異体（Bolt et al., 2003 Eur J Immunol 23: 403-411）））の、抗体依存性細胞障害性（ADCC）を媒介する能力を、NK3.3

細胞（キラー細胞またはエフェクター細胞、Jacky Kornbluth from San Louis Universityによりご厚意で提供していただいた）との同時インキュベーションで、K a t o - I I I細胞（標的細胞、A T C C Cat # H T B - 1 0 3）に対して決定した。簡潔に述べると、K a t o - I I I細胞をカルセシンアセトキシメチルエステル（カルセイン-AM、Sigma-Aldrich Cat # 17783-5MG）で染色して、2度洗浄して、ウェル1つ当たり5000個の細胞の濃度で96ウェルマイクロタイタープレート（96ウェル、U底、透明プラスチック、Corning（登録商標）Costar、Cat # 650160）へピペットで取り（pipetted）、上述の抗体およびタンパク質の段階希釈物（1ml当たり50,000~0.003μg）とともに10分間、プレインキュベートした後、エフェクター細胞を添加した。標的細胞の抗体特異的溶解を算出するために、抗体またはエフェクター細胞を伴わない、標的細胞のみの平行インキュベーションは、ベースラインおよび陰性対照として作用したのに対して、陽性対照または最大溶解または100%の特異的溶解は、1%トリトン-T（商標）100溶液を用いて、標的細胞のみの溶解により決定した。1対5の比での標的およびエフェクター細胞の同時インキュベーション後に、マイクロタイタープレートを遠心分離して、上清液の分取量を別のマイクロタイタープレート（96ウェル、平底、黒色、透明な底を有する、Corning（登録商標）Costar、Cat # 3904）に移し、溶液中の遊離カルセインの濃度を、蛍光カウンター（Victor（商標）3マルチラベルカウンター、Perkin Elmer）で決定した。結果を、図11（A）に示し、全ての試験抗体が、様々な程度でADCCを媒介することが観察された。抗体のFc部分においてグリコシル化を保有せず、したがってエフェクター細胞のCD16a受容体への結合を欠如するN297A_12425は、いかなるADCCも媒介せず、特異的な陰性対照として作用した。標的細胞の一定、かつタンパク質濃度非依存性死滅は、非特異的バックグラウンドに起因して、K a t o - I I I細胞に対するNK3.3細胞の天然死滅活性である。抗体12433は、約60%で標的細胞の最高の特異的溶解を媒介した（シグナルは、NK3.3細胞によるK a t o - I I I細胞のバックグラウンド溶解を推定した）のに対して、抗体12425および10164は、約55パーセントの特異的溶解に達した（シグナルは、NK3.3細胞によるK a t o - I I I細胞のバックグラウンド溶解を推定した）。3つの分子全ての効力（各用量応答曲線の最大半量の死滅での濃度、有効濃度50、EC₅₀）は類似していた。一連の類似した実験では、ネイキッド抗体12425の、ADCCを誘導する能力を、12425-MCC-DM1と比較した。ネイキッド12425と12425-MCC-DM1との間の差は観察されず（データは示していない）、DM1コンジュゲーションは、ネイキッド抗体の、ADCCを誘導する能力を感知できるほど損なわないことを示唆した。

【0399】

さらなる研究では、コンジュゲートされていない抗FGFR2抗体の、補体因子C1qに結合する能力を評価した。補体因子C1qの結合は、in vivoで補体依存性細胞障害性（CDC）および細胞溶解を招く初期ステップである。これらの研究では、96ウェルマイクロタイタープレート（Nunc（登録商標）、Maxisorp（登録商標）、Cat # 439454）のウェルの表面を、抗体12433、12425、N297A_12425および10164の段階希釈物で、暗所で4℃で一晩コーティングした（全て、25~0.02μg/mlの濃度範囲で）。市販の抗体リツキシマブは、陽性対照として作用した。マイクロタイター上に結合抗体分析物の量をモニタリングするために、この手順は、プレートに対する分析物のコーティング有効性を決定するために第2の希釈物を利用してプレート1つにつき2度実施した（三重反復で）。C1q結合は、一定濃度のC1q（Sigma、補体構成成分C1q Cat # C1740-1mg）を添加することにより定量化され、ホースラディッシュペルオキシダーゼHRPにコンジュゲートされたポリクローナルヤギ抗ヒトC1q抗体（AbD Serotec、ヒツジ抗ヒトC1q：HRP、Cat 番号2221-5004P）を使用して検出した。コーティング効率の制御は、ペルオキシダーゼとコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgG抗体断片（Jack

10

20

30

40

50

son ImmunoResearch、Cat # 109-036-003、AffiniPure F(ab')₂断片ヤギ抗ヒトIgG (H+L))を用いて第2の希釈物シリーズで決定された。ともに、TMB基質 (TMBペルオキシダーゼEIA基質キット、Bio-Rad、Cat # 172-1067)を使用して可視化され、続いてUV-Vis分光器 (Molecular Devices、Spectramax (登録商標) Pro 340)を用いて450nmでの光学密度の測定を行った。結果を図11 (B)に示す。試験抗体に結合されるC1qタンパク質の最大量は、全ての分析物に関して同じであった。マイクロタイタープレートに結合された抗体の量は、他の分子のほんのおよそ50%に達する10164抗体を除いて、全ての分析物に関して同じであった。12433、10164およびリツキシマブの効力 (各用量応答曲線の最大半量の結合での濃度、有効濃度50、EC₅₀)はほぼ同じであった。12425抗体のEC₅₀は、3倍高く、N297A__12425のEC₅₀は、約8倍高かった。10164が、他の抗体がしたようにマイクロタイタープレートに対して均等にウェルをコーティングしなかった結果を考慮して、C1q結合における観察結果は、C1qタンパク質への結合において10164のおよそ二倍の容量を含意する。

【0400】

さらに、C1q結合の評価にとって、コンジュゲートされていない抗FGFR2抗体12433、10164、12425およびN297A__12425の、補体依存性細胞障害性(CDC)を誘発する能力を評価した。Kato-III細胞 (標的細胞、ATCC Cat 番号HTB-103)を、ウェル1つ当たり10000個の細胞の濃度で96ウェルマイクロタイタープレート (Costar、滅菌、白色、96ウェル平底細胞培養プレート、Cat # 3610)へ均等に分配して、上述の抗体の段階希釈物とともに10分間、プレインキュベートした後、エフェクター試薬を添加した。この研究で使用されるエフェクター試薬は、ウサギ補体 (PelFreez、Cat # 31060-1)であり、それを1対6の最終希釈でKato-III細胞上へピペットで取った。加湿細胞培養インキュベーター中で37℃で2時間のインキュベーション後に、マイクロタイタープレートを遠心分離して、上清を廃棄して、細胞ペレットを、再構成されたCell Titer Glo (登録商標) (Promega、Cell Titer Glo (登録商標) 発光キット、Cat # G7572)中に溶解した。発光は、マルチラベルリーダー (Perkin Elmer、Victor (商標) 3)において定量化した。結果は、全ての試験抗体に関して図11 (C)に示す。CDCの証拠は、試験抗体 (図11 (C))またはさらなる対照 (市販の抗体Erbix (登録商標) & Herceptin (登録商標)、データは示していない)に関して観察されなかった (図11 (C))。

【0401】

12425-MCC-DM1のin vivo活性におけるADCCの役割を評価するために、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel (商標) (BD Biosciences)を含有する懸濁液中で、10×10⁶個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200μlであった。マウスは、平均腫瘍体積201.4mm³による移植の7日後に、研究に加えた。5つの群 (n=6匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスは10mg/kg i.v. 用量のネイキッド対照IgG、ネイキッドN297A__12425、ネイキッド12425、N297A__12425-MCC-DM1または12425-MCC-DM1を受けた。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した (図11 (D))。ネイキッドADCC枯渇12425変異体 (ネイキッドN297A__12425)は、投与の25日後にADCCコンピテント親12425よりも低い抗腫瘍活性を示した (それぞれ、61%および13% T/C)。これらのデータは、親12425のエフェクター細胞機能が、ネイキッド抗体のin vivo抗腫瘍活性の活性において役割を果たし得ることを示唆する。ADCCコンピテント12425-MCC-DM1およびADCC枯渇N297A__12425-MCC-DM1は、投与の25日後に類似した抗腫瘍活性を示した (それぞれ、45%および32%退縮)。これらのデータは、ADCC活性が消耗性である

10

20

30

40

50

一方で、メイタンシノイドペイロードが、12425-MCC-DM1の頑強な*in vivo*抗腫瘍活性にとって必要かつ十分であることを示唆する。

【0402】

実施例15：FGFR4過剰発現性細胞株におけるシグナル伝達を調節する抗FGFR抗体およびADCの評価

コンジュゲートされていない抗FGFR抗体およびコンジュゲートされた抗FGFR抗体の、FGFR4過剰発現性細胞株におけるFGFRシグナル伝達を調節する能力を評価した。初期研究では、MDA-MB453 (ATCC Cat#HTB-131)細胞における10164 (FGFR2特異的)、12433 (FGFR2特異的)、12425 (FGFR2/4交差反応性)および関連MCC-DM1コンジュゲートの効果を決定した。簡潔に述べると、細胞をCell Bind (商標) 12ウェルプレート (Costar、Cat#3336)において10%FBSを補充したRPMI中に播種して、組織培養インキュベーター中で5%CO₂で37℃で一晩インキュベートした。実験の当日に、細胞培養培地を吸引して、試験抗体または小分子FGFR阻害剤BGJ398のいずれかで置き換えて、全てを、(13~130nM、抗体/ADC、500nM、BGJ398)の最終濃度で、10%FBSを補充したRPMI中で希釈した。次に、細胞を組織培養インキュベーター中で5%CO₂で37℃で2時間インキュベートした。このインキュベーション後、細胞を冷PBS (Lonza、Cat#17516C)で2度洗浄して、氷上に置いて、PhosphoSTOP (Roche、Cat#04906237001)とともに溶解緩衝液 (Cell Signaling Technology、Cat#9803) 300μlを添加した。タンパク質濃度は、BCAアッセイ (Pierce、Cat#23228)により決定した。タンパク質濃度は、BCAアッセイ (Pierce)により決定した。続いて、タンパク質60μgをSDS-PAGEにより分離させて、ニトロセルロース膜上へ転写して、pFRS2 (Cell Signaling Technology、Cat#3864)、総FGFR4 (R&D Systems、Cat#8652)およびβ-アクチン (Bethyl、Cat#A300-485A)またはサイトケラチン (Dako、Cat#M3515)に対する抗体でプローブした。結果を図12(A)に示し、コンジュゲートされていないか、またはMCC-DM1 ADCとしてのいずれの抗体も、2時間でpFRS2シグナルを調節することが不可能であることがわかった。12425抗体4.3nMおよび12425-MCC-DM1 ADC (4.3nM抗体、13nM DM1等価体)を用いてさらなる実験を行い、ここではさらなる時点(4時間、24時間および72時間)を評価した。結果を図12(B)に示す。類似したデータが、RH4横紋筋肉腫細胞型細胞株でも得られた。

【0403】

実施例16：FGFR4過剰発現性細胞株における抗FGFR抗体およびADCの抗増殖効果の評価

上述の実施例9で用いられるのと類似した方法論を使用して、コンジュゲートされていない抗FGFR抗体およびSMCC-DM1とコンジュゲートされた抗FGFR抗体の、FGFR4過剰発現性細胞株パネルの増殖を阻害する能力を評価した。

【0404】

FGFR4に対するその交差反応性と一致して、12425-MCC-DM1は、FGFR4の構成的に活性な突然変異形態を過剰発現するMDA-MB453細胞の成長の強力な阻害剤であった (Roidl et al., 2010, Oncogene, 29, 1543-1552)。FGFR4発現は、抗FGFR4抗体 (Biolegend Cat#324306、図13(A))を使用したFACS解析により確認された。12425は、MDA-MB453においてだけではなく、他のFGFR4過剰発現性細胞株でも、Biolegend抗体に対して類似した結合特性を示した(データは示していない)。コンジュゲートされていない12425抗体は、不活性であったため、この効果は、ADCに特異的であった(図13(A))。さらに、FGFR2特異的抗体(10164)またはADC(10164-MCC-DM1)の投与後に、活性は観察されず、効果がFGFR4発現により駆動されること

を示唆した（図13（A））。これは、FACにより評価されるように、これらの細胞上での検出可能なFGFR2発現の欠如と一致している（データは示していない）。12425-MCC-DM1および12425の類似した効果はまた、FGFR4過剰発現性横紋筋肉腫細胞株RH4（図13（B））およびJR（図13（C））でも観察された。さらなる細胞株に拡張されると、12425-MCC-DM1の活性は、FGFR4過剰発現性胸部および横紋筋肉腫細胞株のサブセットで観察された（図13（D））。

【0405】

実施例17： FGFR4過剰発現性腫瘍におけるFGFR ADCおよびコンジュゲートされていない抗体のin vivo PK-PD

FGFR4陽性MDA-MB-453異種移植片モデルにおけるPD調節を評価するために、雌NSGマウスを利用した。細胞移植の1日前に、雌NSGマウスに、90日持続放出17β-エストラジオールペレット（Innovative Research of America）0.36mgを皮下移植した。17β-エストラジオールペレット移植の1日後、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel（商標）（BD Biosciences）を含有する懸濁液中で、 5×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200μlであった。腫瘍がいったん300~500mm³に達したら、6匹のマウスを無作為に割り当てて、単回静脈内15mg/kg用量の12425-MCC-DM1または対照IgG-MCC-DM1のいずれかを受けさせた（n=3匹/群）。12425-MCC-DM1は、IgG-MCC-DM1を受けた対照マウスに対して、投与の96時間後に核pHH3陽性の顕著な増加をもたらした（代表的な画像を図14（A）に示す）。

【0406】

FGFR4陽性MDA-MB-453異種移植片モデルにおけるPD調節の時間的経過を評価するために、雌NSGマウスを利用した。細胞移植の1日前に、雌NSGマウスに、90日持続放出17β-エストラジオールペレット（Innovative Research of America）0.36mgを皮下移植した。17β-エストラジオールペレット移植の1日後、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel（商標）（BD Biosciences）を含有する懸濁液中で、 5×10^6 個の細胞を皮下注射した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200μlであった。マウスを無作為に割り当てて、単回静脈内15mg/kg用量の12425-MCC-DM1（1群当たり3匹のマウスを、処置投与の24、48、72、96および168時間後に収集した）またはPBS（10ml/kg）のいずれかを受けさせた。腫瘍体積は、無作為時に300~500mm³の範囲であった。メイタンシノイドペイロードの予測される作用機序と一致して、12425-MCC-DM1は、PBS処置対照に対して、投与のおよそ72~96時間後にピークに達する核pHH3陽性の顕著な時間依存的増加をもたらした。切断されたカスパーゼ3免疫反応性におけるピークは、投与のおよそ96~168時間後に見られた。代表的な画像を図14（B）に示す。

【0407】

RH4細胞株を含む胞巣状横紋筋肉腫の一部は、Pax3/7-FOXO1Aトランスロケーションを保有し、これらは、FGFR4 mRNAおよびタンパク質発現の上昇をもたらす。RH4異種移植片モデルにおけるPD調節を評価するために、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel（BD Biosciences）を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200μlであった。腫瘍がいったん500~700mm³に達したら、6匹のマウスを無作為に割り当てて、単回静脈内15mg/kg用量の12425-MCC-DM1、対照IgG-MCC-DM1またはPBS（10ml/kg）のいずれかを受けさせた（n=3匹/群）。12425-MCC-DM1は、IgG-MCC-DM1を受けた対照マウスに対して、投与の96時間後に核pHH3陽性の顕著な増加をもたらした（代表的な画像を図14（C）に示す）。これらの見解は、12425-MCC-DM1が、このFGFR4陽性異種移植片モデルにおいてG2/M

細胞周期停止を引き起こすことを実証している。

【0408】

実施例18： FGFR4過剰発現性腫瘍における抗FGFR ADCのin vivo有効性

12425-MCC-DM1の用量応答抗腫瘍活性を、FGFR4陽性MDA-MB-453乳がん異種移植片モデルにおいて評価した。細胞移植の1日前に、雌NSGマウスに、90日持続放出17β-エストラジオールペレット (Innovative Research of America) 0.36mgを皮下移植した。17β-エストラジオールペレット移植の1日後、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel (商標) (BD Biosciences) を含有する懸濁液中で、 5×10^6 個の細胞を皮下注射した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200μlであった。マウスは、平均腫瘍体積197.9mm³による移植の12日後に、研究に加えた。5つの群 (n=5匹/群) のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBS (10mg/kg)、対照IgG-MCC-DM1 (15mg/kg)、コンジュゲートされていない12425 IgG (15mg/kg) または12425-MCC-DM1 (5、10または15mg/kg) をi.v. 投与した (図15 (A))。対照IgG-MCC-DM1は、このモデルでは活性ではなかった。15mg/kgのネイキッドIgG 12425または5mg/kgの12425-MCC-DM1の単回投与は、投与の29日後に類似した活性を示した (それぞれ、25%および24% T/C)。10および15mg/kgの両方で投与した12425-MCC-DM1は、腫瘍退縮をもたらした (それぞれ、72%および92%退縮)。

【0409】

12425-MCC-DM1の用量応答抗腫瘍活性を、FGFR4陽性、Pax3/7-FOXO1A陽性RH4異種移植片モデルにおいて評価した。雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel (商標) (BD Biosciences) を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200μlであった。マウスは、平均腫瘍体積200.8mm³による移植の11日後に、研究に加えた (図15 (B))。5つの群 (n=8匹/群) のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスにPBS (10mg/kg)、対照IgG-MCC-DM1 (15mg/kg)、コンジュゲートされていない12425 IgG (15mg/kg)、または12425-MCC-DM1 (5、10または15mg/kg) をi.v. 投与した。対照IgG-MCC-DM1は、このモデルでは活性ではなかった。同様に、単回15mg/kg用量のネイキッドIgG 12425は、限られた活性を示した。12425-MCC-DM1は、5、10および15mg/kgの単回用量として抗腫瘍活性を示した (それぞれ、36%、24%、26% T/C)。これらの見解により、Pax3/7-FOXO1Aトランスロケーションが、RH4細胞株を12425-MCC-DM1に対して感受性とさせるのに十分なFGFR4発現をもたらすことが確認される。したがって、12425-MCC-DM1は、Pax3/7-FOXO1Aトランスロケーション陽性横紋筋肉腫を有する患者を処置するのに使用することができた。

【0410】

実施例19： マウス、ラットおよびカニクイザルにおける抗FGFR4 ADCの薬物動態の評価

抗FGFR ADCの薬物動態 (PK) を、1~15mg/kgの範囲の幾つかの用量レベルで腫瘍保有および腫瘍非保有マウスで、1、5および45mg/kgでの腫瘍非保有ラットで、および30mg/kgでのカニクイザルで評価した。全ての研究において、「総」抗体および「抗体薬物コンジュゲート (ADC)」の両方の血清濃度は、確証されたELISA法を使用して全ての動物種で測定された。「総」分画は、コンジュゲートされたDM1を伴うか、または伴わない抗体の測定を指すのに対して、ADC分画は、DM1とコンジュゲートされた抗体のみの測定を指す (1つ以上のDM1分子)。全ての研究

において、感知可能な差は、A D Cと総抗体分画とのクリアランス間で観察されなかった。

【0411】

12425-MCC-DM1 PKを、3 mg/kgの単回IV投与後にSNU16腫瘍保有マウスで研究した。PK試料は、投与の1時間後、24時間後、72時間後、168時間後、および336時間後に収集し、総分画およびADC分画の血清濃度は、この用量では重ねることができた（図16（A））。12425-MCC-DM1の半減期は、SNU16異種移植片の存在下で約1.5日であった。

【0412】

12425-MCC-DM1 PKを、1、5、10または15 mg/kgの単回IV投与後に腫瘍非保有マウスでも研究した。PK試料は、投与の1時間後、6時間後、24時間後、72時間後、96時間後、168時間後、240時間後、336時間後および540時間後に収集した。総分画およびADC分画の血清濃度は、この用量では重ねることができ（図16（B））、PK特性は、腫瘍保有動物に対して、腫瘍非保有動物において類似しているようであった。

【0413】

SNU16腫瘍保有マウスにおける12433-MCC-DM1および10164-MCC-DM1のPKもまた決定した。これらのADCの全体的なPKプロファイルは、12425-MCC-DM1のPKプロファイルと類似しており、得られたデータを表17に概要する。

【0414】

【表17】

表 17. 3mg/kg 用量でのマウスにおける 12433-、12425-および 10164-MCC-DM1 の薬物動態特性

Ab	Cmax (ug/mL)		CL (mL/h/kg)		V(mL/kg)		t1/2 (h)	
	総計	ADC	総計	ADC	総計	ADC	総計	ADC
12425-MCC-DM1	45.0	50.4	1.85	1.72	97.0	89.5	36.4	36.1
12433-MCC-DM1	52.4	42.7	1.61	1.95	101.0	122.9	43.5	43.8
10164-MCC-DM1	42.8	37.5	1.18	1.28	101.4	117.5	59.4	64.0

【0415】

12425-MCC-DM1 PKを、2つの用量レベル：IV投与された1および5 mg/kgで腫瘍非保有ラットで研究した。PK試料は、0.5時間、1時間、2時間、6時間、8時間で、また1日目、2日目、4日目、8日目、11日目、14日目、21日目および35日目に収集した。「総」および「ADC」種に関する濃度-時間プロファイルは、両方の用量レベルでほぼ重ねることができた（図16（C））。終末排せつ相は、1 mg/kg用量群でわずかに急勾配であったが、これは、より後期の時点での標的媒介性薬物体内動態（drug disposition）（TMD）の結果であり得る。同様に、総分画およ

びADC分画に関するクリアランス値は、1 mg/kg用量ではそれぞれ、 0.757 ± 0.088 mL/h/kg および 0.813 ± 0.041 mL/h/kg であった一方で、それぞれ、 0.623 ± 0.027 mL/h/kg および 0.607 ± 0.019 mL/h/kg のわずかに低い値が、5 mg/kg 用量で認められた。12425-MCC-DM1 ADC種は、5 mg/kg 用量レベルで、およそ3.9日の終末半減期を有する。さらなる研究では、ラットPKはまた、5 mg/kg および 45 mg/kg 用量レベルで決定した。5 mg/kg 用量での半減期は上述の値に類似していたのに対して、45 mg/kg 用量では、半減期は、それぞれ、総分画およびADC分画に関して163.9 h、121.3 h（およそ5日）であり、これらの値は、非FGR2/4交差反応性対照ADCに関する観察と類似しており、任意の考え得るTMDクリアランス経路の飽和を示唆した。

10

【0416】

12433-MCC-DM1 および 10164-MCC-DM1 PKもまた、類似した研究で決定され、得られたPKパラメーターを表18に示す。用いた用量レベルでは、総およびADCの半減期およびクリアランスの類似した推定値が、試験した3つのADC全てに関して得られることがわかった。

【0417】

【表18】

表 18. ラットにおける 12433-、12425-および 10164-MCC-DM1 の薬物動態特性

20

用量 (mg/kg)	Ab	t1/2 (h)		AUCinf (ug.h/mL)		CL (mL/h/kg)	
		総計	ADC	総計	ADC	総計	ADC
5	12433-MCC-DM1	71.1	59.0	388.8	374.0	0.536	0.557
45	12433-MCC-DM1	176.7	131.9	4399.3	3929.8	0.426	0.477
5	12425-MCC-DM1	77.0	64.0	12853	12874	0.389	0.388
45	12425-MCC-DM1	163.9	121.3	103265	103647	0.436	0.434
5	10164-MCC-DM1	88.0	78.0	12677	14644	0.394	0.341
45	10164-MCC-DM1	140.1	110.3	139842	150433	0.322	0.299

30

【0418】

12425-MCC-DM1 PKを、3匹のカニクイザル（雄1匹、雌2匹）の群への単回30 mg/kg IV用量の投与後に研究した。血清試料は、1日目に投与0時間（投与前）に、および0.25時間、2時間、4時間、6時間、24時間、48時間、72時間、168時間および240時間後に収集した。12425-MCC-DM1への最大曝露は、IV注射直後、即ち0.25時間に観察され、これは、第1のサンプリング時点であった。時間的経過は、長期排せつ相により特徴付けられ、総分画およびADC分画に関するプロファイルは、サンプリングの時間的経過にわたって重ねることができた（図16（D））。終末半減期は、およそ6～7日であった。

40

【0419】

10164-MCC-DM1 PKもまた、3匹のカニクイザルの群への単回30 mg/kg IV用量の投与後に研究した。この試薬に関する時間的経過はまた、長期排せつ相（終末半減期6～7日）により特徴付けられ、10164-MCC-DM1および12

50

4 2 5-MCC-DM1の両方のPKパラメーターを表19に示す。

【0420】

【表19】

表 19. 30mg/kg IV 投与後のカニクイザルにおける 12425-および 10164-MCC-DM1 の薬物動態特性

被験物質		Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	AUC0-240h ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	AUC0-inf ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	CL (mL/h/kg)	t1/2 (h)
12425	総計	785.6 $\pm$ 72.2	64612 $\pm$ 6477	99979 $\pm$ 12060	0.303 $\pm$ 0.038	166.5 $\pm$ 36.4
	ADC	780.6 $\pm$ 84.2	66656 $\pm$ 7577	99113 $\pm$ 16895	0.310 $\pm$ 0.052	151 $\pm$ 22.3
10164	総計	1032 $\pm$ 423	79535 $\pm$ 6506	124946 $\pm$ 11687	0.242 $\pm$ 0.0237	175.1 $\pm$ 44.1
	ADC	909.5 $\pm$ 224.3	81150 $\pm$ 4658	122061 $\pm$ 8615	0.247 $\pm$ 0.018	158.1 $\pm$ 33

10

【0421】

実施例 20: *in vitro* および *in vivo* での配列修飾された抗FGFR抗体およびADCの活性の評価

20

潜在的な構造の傾向 (liabilities) が、最終的なタンパク質の不均一性に影響を及ぼし得て、また例えば抗体製造可能性および免疫原性に影響を与え得る治療用抗体の配列に存在し得ることが理解される。かかる傾向は、グリコシル化部位、不對システイン、潜在的な脱アミド部位等を含み得る。かかる潜在的な傾向の危険性を低減するために、突然変異を導入して、これらの傾向の1つまたは複数を除くことができる。例えば、潜在的な脱アミド部位は、単独で、または他の構造変化と併せて、置き換えることができる。潜在的な脱アミド部位の例としては、10164および12425の重鎖CDR2におけるDGが挙げられる (表1を参照)。これらの残基を他の適切なアミノ酸に突然変異させることができる。非限定的な例として、10164 HCDR2中のアスパラギン酸 (D) をグルタミン酸 (E) またはスレオニン (T) に突然変異させることができる。12425では、HCDR2 グリシン (G) を、アラニン (A) のような別のアミノ酸に突然変異させることができる。

30

【0422】

また、抗体が、アミノ酸レベルで各々の生殖系列配列と異なる場合、抗体は、その生殖系列配列に突然変異し戻される (mutated back) ことができることが理解されるべきである。かかる補正突然変異は、1つまたは複数の位置で行われることができ、標準的な分子生物学技法を使用して、または遺伝子合成により生成され得る。非限定的な例として、12425重鎖の重鎖配列 (配列番号9、表1を参照) は、1位でEからQにより、相当する生殖系列配列とは異なり、軽鎖 (配列番号17) は、85位でVに代わるTにより、相当する生殖系列とは異なる。したがって、12425中のアミノ酸は、これらの部位のいずれかまたは全てで修飾され得る。

40

【0423】

この出願で記載される抗体薬物コンジュゲートを生成するのに用いられる化学は、抗体配列におけるリシン (K) 残基へのコンジュゲーションに依存する。これらのリシン残基が、エピトープ認識に関与される領域内に、例えばCDR領域に存在する場合、かなりコンジュゲーションがこれらの部位で行われる場合には、抗体薬物コンジュゲートの、その所定の標的に結合する能力を変更させ得る。この潜在的な危険性を軽減するために、かかるリシン残基を、アルギニン、アスパラギンまたはグルタミンのような代替的な適切なアミノ酸に突然変異させることができる。1つのリシンが、12425の重鎖CDR2およ

50

びCDR3領域の両方に存在する。これらのリシンのいずれか1つまたは複数が、アルギニン、アスパラギンまたはグルタミンのような代替的な残基に突然変異され得る。

【0424】

上述の変化の幾つかを12425抗体へ導入して、抗体20562を生じた(表1)。この抗体は、FGFR2に結合するその能力、SNU16のようなFGFR2増幅細胞株の増殖を阻害して、*in vivo*でSNU16細胞に対して抗腫瘍効果を引き起こすその能力に関して、12425と比較した。ヒトFGFR2 I I I bおよびFGFR4に対する20562の親和性は、類似したアッセイ条件下で12425の親和性と類似していることがわかった(20562 FGFR2 I I I b親和性推定値: 9 nM、ヒトFGFR4親和性推定値: 3.3 nM)。実施例6に記載する方法論を用いて、12425-MCC-DM1と類似して、20562-MCC-DM1もまた、*in vitro*でSNU16細胞の増殖の強力な阻害剤であった(図17(A))。*in vivo*での20437-MCC-DM1の効力を評価するために、雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーMatrigel(商標)(BD Biosciences)を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。マウスは、平均腫瘍体積217.1 mm³による移植の7日後に、研究に加えた。5つの群(n=6匹/群)のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスはPBS(10 mg/kg)または3 mg/kg i.v.用量の12425-MCC-DM1または20562-MCC-DM1を受けた。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した(図17(B))。12425-MCC-DM1およびその変異体20562-MCC-DM1はともに、FGFR2増幅SNU16異種移植片に対して*in vivo*で類似した活性を有した。これらのデータは、ADCとして*in vivo*活性に影響を与えることなく、親抗体のDG部位を除去することが可能であることを示唆している。

10

20

【0425】

実施例21: 親和性成熟FGFR ADCの生成および特徴付け

選択された抗FGFR抗体の生物学的活性に対する親和性の影響を評価するために、親和性の最適化を、12433、10164および12425クローンで実施した。これらの研究では、L-CDR3およびH-CDR2領域が、トリヌクレオチド定方向突然変異誘発を使用したカセット突然変異誘発により並行して最適化された(Virnekas et al., 1994 Nucleic Acids Research 22: 5600-5607)一方で、フレームワーク領域が一定に保たれた。親和性成熟に関するクローニングに先立って、親Fab断片は、相当する発現ベクターpM(登録商標)x11から、Xba I/EcoRIを介して、Cys Display(商標)ベクターpMORPH(登録商標)30へ移行させた。

30

【0426】

親Fab断片のL-CDR3を最適化するために、結合剤のL-CDR3を除去して、多様化されたL-CDR3のレパートリーで置き換えた。各親Fabに関して、多様化されたH-CDR2とともに設定された第2のライブラリーを生成した。各成熟ライブラリー(L-CDR3およびH-CDR2)に関して、抗体ディスプレイファージを調製して、ファージ力価をスポット滴定により決定した。ライブラリーの増幅は、他の箇所に記載するように実施した(Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem 278: 38194-38205)。品質管理のため、単一クローンを無作為に採取して、配列決定した。

40

【0427】

親和性が改善された結合剤の選択のため、成熟ライブラリーに由来するファージは、ビオチン化ヒトFGFR2を使用して、3ラウンドの溶液パニングに付された。ストリンジエンシーは、各パニングラウンドにおける抗原濃度を低減させることにより増大した(Low et al., 1996 J Mol Biol 260(3): 359-368)。抗原の低減に加えて、オフ速度選択(Hawkins et al., 1992 J Mol Biol 226: 889-896)を実施した。これは、RTでの長期的にわたる洗浄ステップと組み合わせた。一般的なパニング手順は、上述するように実施された(溶液パニング)。

50

【0428】

選択されるサブコードに関して、実施されたH-C D R 2親和性成熟パニングの第2ラウンドのパニングアウトプットは、L-C D R 3でさらに多様化させた。ライブラリー生成は、上述するように正確に行われた。改善された結合剤の選択のため、新たな生成ライブラリーをさらなる2ラウンドの溶液パニングに付した。

【0429】

同定された配列特有のクローンを、I g Gと表し、ヒトF G F R 2に対する親和性を、実施例1および実施例2に記載する方法論に類似したS E TまたはB i a c o r e（登録商標）のいずれかの方法論を使用して決定した。3つの親抗体からの80個を上回るクローンを評価して、12433抗体に由来するクローンに関しては3～6倍、10164由来のクローンに関しては27倍、および12425由来の抗体に関しては68倍の親和性改善が得られた。10164に由来する最高の親和性クローンを20809と称し、ヒトF G F R 2に対するその親和性は、450 p Mであると決定された。興味深いことに、この抗体はまた、7.4 n Mの親和性推定値でヒトF G F R 4にも結合した。12425に由来する最高の親和性抗体を20811と称し（表1）、ヒトF G F R 2に対するその親和性は、110 p Mであると決定された。F G F R 4に対するこの抗体の親和性は、75 p Mであると決定された。

【0430】

さらなる研究において、20908および20811の両方を、S M C C - D M 1に直接コンジュゲートして、20809-M C C - D M 1および20811-M C C - D M 1を生じた。これらのA D Cの、S N U 16の成長を阻害する能力を図18（A）に示す。i n v i v o抗腫瘍活性に対する親和性の影響を、F G F R 2増幅S N U 16異種移植片モデルで評価した。雌ヌードマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に50%フェノールレッドフリーM a t r i g e l（商標）（B D B i o s c i e n c e s）を含有する懸濁液中で、 10×10^6 個の細胞を皮下移植した。懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は200 μ lであった。マウスは、平均腫瘍体積217.6 mm³による移植の7日後に、研究に加えた。5つの群（n=6匹/群）のうちの1つに無作為に割り当てた後、マウスはP B S（10 mg/k g）または3 mg/k g i . v . 用量の12425-M C C - D M 1、20811-M C C - D M 1、10164-M C C - D M 1または20809-M C C - D M 1を受けた。腫瘍は、1週につき2度カリパスで測定した（図18（B））。10164-M C C - D M 1およびその親和性成熟変異体20809-M C C - D M 1は、S N U 16異種移植片に対して類似した活性を示した。12425-M C C - D M 1は、抗腫瘍活性に関してその親和性成熟変異体20811-M C C - D M 1を上回る優位性を示した。これらのデータは、親和性成熟がM C C - D M 1 A D Cとしてi n v i v oで改善された活性をもたらさなかったことを示唆している。

【0431】

実施例22： 重水素交換質量分析（H D x - M S）によるF G F R 2およびその抗体複合体のエピトープマッピング

重水素交換質量分析（H D x - M S）は、タンパク質のアミド骨格への重水素取込みを測定するものである。これらの測定値は、アミドの溶媒接近性および骨格アミドの水素結合ネットワークの変化に対して高感度である。H D x - M Sは、アボおよびリガンド結合などの2つの異なる状態のタンパク質を比較するために使用されることが多く、ペプシンによる迅速な消化とカップリングする。そのような実験において、当業者であれば、2つの異なる状態間で異なる重水素取込みを示す領域、典型的には、10～15アミノ酸を見つけることができる。保護される領域は、リガンド結合に直接関与するか、またはリガンドの結合によりアロステリックに影響される。

【0432】

これらの実験では、E. コリ（E. Coli）由来のF G F R 2 D 2 - D 3タンパク質（配列番号135、以下を参照）の重水素取込みは、3つの治療用抗体：12425、10164および12433の非存在および存在下で測定された。抗体の結合時に重水素取込

みの低下を示す F G F R 2 中の領域はエピトープ中に含まれる可能性が高いが、測定 of 性質のため、直接的な結合部位から遠い変化を検出することも可能である（アロステリック効果）。通常、最も多い量の保護を有する領域は、直接結合に関与するが、これは常に当てはまるわけではない。アロステリック効果に由来する直接結合事象を解明するためには、直交測定（例えば、X 線結晶分析、アラニン突然変異誘発）が必要である。

【0433】

【表20】

表 20. FGFR2 D2-D3 構築物

配列番号: 135
長さ : 237 アミノ酸
種類 : タンパク質
生物 : ヒト
MAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPTMRWLKNG KEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCV VENEYGSINHTYHLDVVERS PH RPILQAGLPANASTVVG DVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLK HSGINSSNAEVLALFNVTEADAGEYICKVSNYIGQANQSAWLT VLPKQQAPGREKEHHH HHH

10

20

【0434】

この実施例に記載するエピトープマッピング実験は、Waters HDx-MSプラットフォームで実施され、これは、LEAPオートサンプラー、nanoACQUITY UPLC SystemおよびSynapt G2質量分析計を含む。研究は、LeapShellソフトウェアにより作動されるLEAPオートサンプラーにより自動化され、これは、重水素交換反応の開始、反応時間管理、クエンチ反応、UPLCシステムへの注入および消化時間管理を実施した。Leapオートサンプラーは、HDx反応のために25℃で維持され、またそれぞれタンパク質およびクエンチ溶液の保管用に2℃に維持された2つの温度管理スタックを装備していた。三重反復対照実験を、重水素交換時間25分で抗原に対して実施した。HDxは、クエンチ緩衝液（6M尿素および1M TCEP pH=2.5）でクエンチした。クエンチした後、抗原を、それが、オンラインペプシン消化に付されるUPLCシステムに12℃で注入して、続いて流速40μL/分でWaters BEH C18 1×100mmカラム（1℃で維持される）にわたる迅速な8分で2%から35%へのアセトニトリル勾配に付した。三重反復実験は、まさに対照実験として抗原-mAb複合体に対して実施されたが、但し、これらの実験では、抗原は、重水素交換に先立って25℃で抗体とともに30分間インキュベートされた。

30

【0435】

これらの測定の結果を図19（A）および図19（B）に概要する。図19（A）では、mAbの非存在（対照）下および存在下でのFGFR2ペプチドに関する平均重水素取込みが示される。この図では、2つの差：対照とmAbとの差、およびmAb群間での差を検討することが有用である。図19（B）では、mAbと対照試料との間の重水素取込みにおける差が、測定中の標準誤差で除算される。差は、それらが絶対スケールで0.5Daを上回る場合に（図19（A））、および標準誤差により除算された差の比が、-3.0未満またはそれに等しい場合に（図19（B））有意であるとみなされる。この解析から、本発明者らは、mAb結合時に保護されるFGFR2の領域を、高、中および低量の保護のカテゴリーに順位付けすることができる。高い保護のFGFR2領域は、特異的な抗体とのエピトープの形成に潜在的に関与するが、より低い保護領域に関して他の寄与を除外することはできない。

40

50

【0436】

FGFR2への10164の結合時に、FGFR2の下記の2つの領域：配列番号137の残基174～189および198～216における高量の保護が観察される。これらの領域は、特異的にβCのN末端に対するβB、およびβEに対するβC'ループからなるD2ドメインに位置する（図19（C）および（D））。領域222～231に見出される低保護の1つの領域が存在する。しかしながら、この領域は、全ての研究抗体の結合時に保護され、この観察は、この領域が、本質的に非特異的およびアロスティックであり得るその局所水素結合ネットワークの安定化を受けることを示唆している。FGFR2に対する抗体12425の結合はまた、配列番号137の残基174～189および198～216の領域で高量の保護を引き起こす。さらに、12425ファミリーを用いる場合、配列番号137の残基160～173（図19（A）および（B））の領域での高量の保護も観察された。これらの領域は、公開された結晶学データからFGF2およびFGF1と相互作用することが知られているFGFR2の領域を含む（Plotnikov et al., M. Cell 2000, 101, 413-424, Beenken et. al., M. J. Biol. Chem. 2012, 287, 3067-3078）。この領域の保護は、12425ファミリーの抗体に特有である。研究される抗体のうち、12433は、FGFR2のD3ドメインとの相互作用を通じてFGFR2のIIIbアイソフォームを特異的に標的とする点で特有である。12433に関して、ペプチド338～354における高量の保護（およそ2Da）および338～345由来のより短いN末端断片におけるわずかな量の保護が観察された。この観察は、12433結合時に保護される338～354ペプチドの一部が、領域346～354であることを示唆している（図19（A）および図19（B））。領域346～354は、IIIcアイソフォームに対してIIIbアイソフォームに特異的である4つの残基を含有し、これらの残基は、Q348、A349、N350およびQ351を含む。さらなる研究において、10164および12425の親和性成熟バージョン（以下の実施例23を参照）を評価して、観察される保護領域の観点で、それらの各々の親抗体に類似していることがわかった。

【0437】

さらに、類似した方法を使用して、FGFR2/4交差反応抗体12425の存在下でFGFR4の保護を検査する重水素交換研究を実施した。FGFR4 D1～D3構築物（配列番号124、以下を参照）を使用した予備解析により、12425の結合が、D3領域ではいかなる保護も引き起こさないことが示唆された。保護は、D1およびD2ドメイン内の領域に限定されるようである。

【0438】

【表21】

表 21. FGFR4 D1-D3 構築物

配列番号：124
長さ：371 アミノ酸
種類：タンパク質
生物：ヒト
LEASEEVELEPCLAPSLEQQEQELTVALGQPVRLCCGRAERGHHWYKEGSRLAPAGRVR GWRGRLEIASFLPEDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSLTSNDDDEDPKSHRDPNSRHS YPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLKDGQAFHGENRIGGI RLRHQHWSLVMSVPSDRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDVLLERSPHRPILQAGLPANTT AVVGSDVELLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKTADINSSEVEVLYL RNVSAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPTWTAAAPARYTDKLEFRHDSGL NDIFEAQKIEWHE

【0439】

実施例23： ヒトFGFR2／12425FabおよびFGFR4／12425Fab複合体のX線結晶学的構造決定

12425のFab断片（表22）に結合されたヒトFGFR2 ECD断片（FGFR2ドメイン2またはFGFR2 D2、配列番号138、表22）またはヒトFGFR4 ECD断片（FGFR4ドメイン2またはFGFR4 D2、配列番号143、表22）の結晶構造が決定される。以下に詳述するように、FGFR2 D2またはFGFR4 D2が発現されて、精製されて、12425Fabと混合されて、複合体を形成した。続いて、タンパク質結晶学を用いて、12425Fabに結合されたFGFR2 D2またはFGFR4 D2に関する原子分解能データを作成して、エピトープを規定した。FGFR2の結晶学的エピトープは、重要なエピトープ残基を突然変異させること、および表面プラズモン共鳴（SPR）技術を用いて12425への突然変異FGFR2の結合を測定することにより、さらに確証された。

10

【0440】

結晶学およびSPR用のタンパク質生産

結晶学およびSPR用に生産されるタンパク質の配列を表22に示す。FGFR2 D2の構築物は、組換え発現ベクター由来のN末端およびC末端残基（小文字で示される、配列番号137）とともに、ヒトFGFR2（UniProt識別子P21802-3、配列番号137）の残基146～249（下線を付した）を含む。FGFR4 D2（配列番号143）の構築物は、組換え発現ベクター由来のN末端およびC末端残基（小文字で示される）とともに、ヒトFGFR4（UniProt識別子P22455-1、配列番号142）の残基140～242（下線を付した）を含む。FGFR2ドメイン2～ドメイン3（D2D3）の構築物は、残基140～369（配列番号137ではイタリック体）を含む。FGFR2 D2D3の野生型（WT）およびK176A／R201A二重突然変異バージョンはともに、SPRによるエピトープ確証用に生産される（それぞれ、配列番号144および配列番号145、小文字は、組換え発現ベクター由来のN末端およびC末端残基である）。12425Fabに関して、重鎖および軽鎖の配列が示される（それぞれ、配列番号139および配列番号140）。

20

【0441】

【表 2 2】

表 22: 結晶学およびSPRに使用されるタンパク質の配列

構築物	1文字コードでのアミノ酸配列	配列番号
ヒト FGFR2 (P21802-3)	MVSWGRFICLVVVTMATLSLARPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQ ISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRT VLIGEYLQIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTD ISSGDDDDTDGAEDFVSE <u>NSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVP</u> <u>AANTVKFRCPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQ</u> <u>HWSLIMESVVP</u> SDKGNVTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSHPRI LQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKY GPDGLPYLKVLKHSNGINSSNAEVLALFNVTEADAGEYICKVSNYIG QANQSAWLTVLPKQQAPGREKEITASPDYLEIAIYCIGVFLIAC MVVTVILCRMKNNTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLRRQVTVSA ESSSSMNSNTPLVRITTRLSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWE FPRDKLTLGKPLGEGCFGQVVMMAEAVGIDKDKPKEAVTVAV KMLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQD GPLYVIVEYASKGNLREYLRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMT FKDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTENNV KIADFGLARDINNIDYYKKTNGRLPVKWMAPEALFDRVYT	137

10

20

	HQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMD KPANCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRILTLT TNEEYLDLSQPLEQYSPSYPDTRSSCSSGDDSVFSPDMPYEP CLPQYPHINGSVKT	
FGFR2 D2	mNSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNP MPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNVTCVVENEYGSINHTYHLDVVIvprgslhhehhhh	138
12425 Fab 重鎖	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAP GKGLEWVSVIEGDGSYTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREKTYSSAFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTH	139
12425 Fab 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISSDLN WYQQKPGK APKLLIYDASN LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVY YCQQHYSPSHTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	140
ヒト FGFR4 (P22455-1)	MRLLLALLGVLLSVPGPPVLSLEAEEVELEPCLAPSLEQQEQ ELTVALGQPVR LCCGRAERGGHWYKEGSRLAPAGRVRGWR GRLEIASFLPEDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSL TSSND DEDPKSHRDPSNRHSYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNT <u>VKFRCPAAGNP TPTIRWLKD GQAFHGENRIGGIRLRHQHWSL</u> <u>VMESVVP SDRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDVLERSPHRPIL</u> QAGLPANTTAVVGSDVELLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSS FGADGFPYVQVLKTADINSSEVEVLYLRNVSAEDAGEYTCLA GNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPTWTAAAP EARYTDIILYASGSL ALAVLLLLAGLYRGQALHGRHPRPPATVQKLSRFPLARQFSL ESGSSGKSSSSLVRGVRLSSSGPALLAGLVSLDPLDPLWEFP RDRLVLGKPLGEGCFGQVVRAEAFGMDPARPDQASTVAVK MLKDNASDKDLADLVSEMEVMKLIGRHKNIINLLGVCTQEG PLYVIVECAAKGNLREFLRARRPPGPD LSPDGPRSSEGPLSFPV LVSCAYQVARGMQYLESRKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIA	142

10

20

30

40

	DFGLARGVHHIDYYKKTSTNGRLPVKWMapeALFDRVYTHQS DVWSFGILLWEFTLGGSPYPGIPVEELFSLLREGHRMDRPPH CPPELYGLMRECWAAPSQRPTFKQLVEALDKVLLAVSEYY LDLRLTFGPYSPSGGDASSTCSSSDSVFSDPLPLGSSSFPPGS GVQT	
FGFR4 D2	mHSYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGNP TPTIRWLKDQGAFHGENRIGGIRLRHQHWSLVMESVVPDRG TYTCLVENAVGSIRYNYLLDVLlvprgslehhhhh	143
FGFR2 D2D3	mAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFR CPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIM ESVVPSDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSPPHRLQA GLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKY GPDGLPYLKVLKHSGINSSNAEVLALFNVTEADAGEYICKVS NYIGQANQSAWLTVLPKQQAPGREKEhhhhh	144
FGFR2 D2D3 K176A/R210A	mAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVAFR CPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVANQHWSLIM ESVVPSDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSPPHRLQA GLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKY GPDGLPYLKVLKHSGINSSNAEVLALFNVTEADAGEYICKVS NYIGQANQSAWLTVLPKQQAPGREKEhhhhh	145

10

20

【0442】

FGFR D2は、E. コリ (E.coli) BL21 (DE3) (Novagen[®]、EMD Millipore) で発現された。18℃でのIPTGによる一晚の誘導後に、細胞を収集して、-80℃で凍結させて、溶解させた。封入体を20mMリン酸ナトリウム pH7.5、300mM NaClおよび8M尿素で抽出して、同じ緩衝液中で予め平衡化したNi-NTAカラム上にのせた。カラムを20mMリン酸ナトリウム pH7.5、300mM NaCl、50mM硫酸アンモニウムおよび20mMイミダゾールで洗浄した後、20mMリン酸ナトリウム pH7.5、300mM NaCl、50mM硫酸アンモニウムおよび300mMイミダゾールで溶出させた。続いて、溶出タンパク質を20mMリン酸ナトリウム pH6.5 (緩衝液A) で12倍希釈して、緩衝液A+2%の20mMリン酸ナトリウム pH6.5、1.5M NaCl、50mM硫酸アンモニウム (緩衝液B) 中で予め平衡化したHiTrap S HPカラム (GE Healthcare) 上にのせた。Sカラムは、緩衝液A+2%~100%緩衝液Bの勾配により溶出した。FGFR2 D2を含有する主要ピークを収集して、濃縮して、20mM Hepes pH7.5、150mM NaCl中で平衡化したHiLoad (登録商標) 16/60 Superdex (商標) 75 (GE Healthcare) 上にのせた。ピーク分画をSDS-PAGEおよびLCMSにより解析して、続いて12425Fabと複合体を形成するためにプールした。

30

40

【0443】

FGFR4 D2は、E. コリ (E.coli) 株Shuffle (登録商標) T7 Express (New England Biolabs[®]) で発現された。18℃でのIPTGによる一晚の誘導後に、細胞を収集して、50mMリン酸ナトリウム pH7.5、300mM NaCl+0.1mg/mlのウシ膵臓由来のデオキシリボヌクレアーゼI (

50

Sigma（登録商標））および溶解緩衝液50mlにつき1錠剤のcOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets（Roche（登録商標））中に溶解させた。溶解は、15,000rpmで1時間の遠心分離により清澄化されて、次に、Talon^R樹脂（Clontech（登録商標））を、バッチ結合のために4℃で一晩、上清に添加した。翌日、樹脂をカラムに充填して、50mMリン酸ナトリウムpH7.5、300mM NaCl、20mMイミダゾールで洗浄して、50mMリン酸ナトリウムpH7.5、300mM NaCl、300mMイミダゾールで溶出させた。続いて、溶出タンパク質を50mMリン酸ナトリウムpH7.5（緩衝液C）で12倍希釈して、緩衝液C+2%の50mMリン酸ナトリウムpH7.5、1M NaCl（緩衝液D）中で予め平衡化したHiTrap S HPカラム（GE Healthcare）上にのせた。Sカラムは、緩衝液C+2%~100%緩衝液Dの勾配により溶出した。FGFR4 D2を含有する主要ピークを収集して、濃縮して、20mM Hepes pH7.5、150mM NaCl中で平衡化したHiLoad（登録商標）16/60 Superdex（商標）75（GE Healthcare）上にのせた。ピーク分画をSDS-PAGEおよびLCMSにより解析して、続いて12425 Fabと複合体を形成するためにプールした。

10

【0444】

12425 Fabは、固定化パピイン（Pierce）による完全長12425 IgGの切断により生産される。20mMリン酸ナトリウムpH7.0および10mM EDTA中の20mg/mlでの12425 IgGを、80:1の重量比で固定化パピインと混合した。混合物を15mlのチューブ中で37℃で一晩回転させた。翌日、固定化パピインを、重力流カラムにより除去して、FabおよびFcセグメントの両方を含有するフロースルーを収集して、HiTrap（商標）MabSelect SURE（商標）カラム（GE Healthcare）上にのせて、Fcセグメントを除去した。Fab断片のみを含有するこのステップからのフロースルーを濃縮して、20mM Hepes pH7.5、150mM NaCl中で平衡化したHiLoad（登録商標）16/60 Superdex（商標）75（GE Healthcare）上にのせた。ピーク分画をSDS-PAGEおよびLCMSにより解析して、続いてFGFR2 D2またはFGFR4 D2と複合体を形成するためにプールした。

20

【0445】

FGFR2 D2/12425およびFGFR4 D2/12425 Fab複合体の結晶化および構造決定

30

FGFR2 D2またはFGFR4 D2と12425 Fabとの複合体は、FGFR2 D2またはFGFR4 D2を12425 Fabと2:1のモル比（LCUVによって測定された濃度）を混合すること、氷上で30分間インキュベートすること、および20mM Hepes pH7.5、150mM NaCl中で平衡化したHiLoad（登録商標）16/60 Superdex（商標）75（GE Healthcare）上で複合体を精製することにより調製された。ピーク分画をSDS-PAGEおよびLCMSにより解析した。

【0446】

FGFR2 D2/12425 Fab複合体を結晶化するために、複合体を含有する分画をプールして、約30mg/mlに濃縮した。トリプシン（1mM HClおよび2mM CaCl₂中に溶解、1mg/mlでの）を、1:100の容量比で複合体へ添加して、結晶化を促進した（Wernimont et al., (2009) Plos One 4:e5095）。FGFR2 D2/12425 Fab/トリプシン混合物を即座に遠心分離して、結晶化に関してスクリーニングした。

40

【0447】

結晶は、シッティングドロップ蒸気拡散により成長させた。詳細には、タンパク質0.1μlを、0.1Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.0、20%（w/v）PEG 6000を含有するリザーバ溶液0.1μlと混合して、ドロップを同じリザーバ溶液4

50

5 μ l に対して 4 $^{\circ}$ C で平衡化した。

【0448】

FGFR4 D2/12425 Fab 複合体を結晶化するために、複合体を含有するサイズ排除分画をプールして、20 mg/ml に濃縮して、遠心分離して、結晶化に関してスクリーニングした。結晶は、FGFR2 D2/12425 Fab 複合体と同じ方法（上述する）で成長させたが、但し、リザーバ溶液は、0.2 M ギ酸マグネシウム、20% (w/v) PEG 3350 を含有し、結晶は 20 $^{\circ}$ C で成長させた。

【0449】

データ収集前に、FGFR2 D2/12425 Fab および FGFR4 D2/12425 Fab 結晶の両方を、さらなる 22.5% グリセロールを含有するリザーバ溶液に移して、液体窒素中で急冷した (flash cooled)。回折データは、先端放射光施設 (Argonne National Laboratory, USA) にあるビームライン 17-ID で収集した。データを加工処理して、HKL 2000 (HKL Research) を使用して 2.8 $\text{\AA}$ で縮尺した。構造はともに、FGFR2 D2 構造 (PDB ID: 3DAR) および検索モデルとしての組織内 Fab 構造を用いた Phaser (McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674) を使用した分子置換により解析した。最終的なモデルが COOT で構築され (Emsley & Cowtan (2004) Acta Cryst. 60:2126-2132)、Buster (Global Phasing, LTD) で改良した。12425 Fab 中で任意の原子の 5 $\text{\AA}$ 以内に原子を含有する FGFR2 D2 または FGFR4 D2 の残基は、PyMOL (Schrodinger, LLC) により同定され、表 23 および表 24 に列挙される。

10

20

【0450】

FGFR2 の突然変異誘発および SPR アッセイ

Quickchange^R 部位特異的突然変異誘発キット (Agilent Technologies) により、K176A/R210A 二重突然変異を FGFR2 D2D3 構築物に導入した。WT および突然変異 FGFR2 D2D3 タンパク質は、FGFR4 D2 タンパク質に関するのと同じ手順を使用して生産した。

【0451】

SPR アッセイで使用される試薬に関して、親和性純粋な F(ab)' 断片抗ヒト IgG Fc γ 断片 (109-006-098) は、Jackson Immuno Research Laboratory から購入した。センサーチップ CM5 (BR-1006-068)、グリシン pH 2.0 (BR-1003-55) および HBS-EP⁺ 緩衝液 (BR-1006-69) は、GE Healthcare に発注した。BSA は、Gibcor (登録商標) (15260) からのものであり、ヘパリンは、Sigma^R (H3149-100KU) からのものである。

30

【0452】

SPR 研究は全て、評価ソフトウェアバージョン 1.1 および CM5 センサーチップを用いて Biacore (登録商標) T100 を使用して実施した。0.5 mg/ml の BSA および 10 μ g/ml のヘパリンを有する HBS-EP⁺ を、全ての実験に関して実行緩衝液として使用した。固定化レベルおよび分析物相互作用は、応答単位 (RU) により測定された。パイロット実験を実施して、抗ヒト Fc 抗体の固定化、続く 12425 IgG の捕捉の実現可能性を試験および確認した。

40

【0453】

12425 動態測定に関して、抗体をチップ上に捕捉して、続いて WT または突然変異 FGFR2 D2D3 タンパク質を流した。簡潔に述べると、pH 4.75 での 50 μ g/ml の抗ヒト Fc 抗体は、4 つ全てのフローセルで 10 μ l/分の流速でアミンカップリングにより CM5 チップ上に固定化されて、6000 RU に達した。3 μ g/ml の 12425 を、試験フローセル上に 10 μ l/分で 10 秒間注入した。0.078~100 nM の 2 倍希釈の FGFR2 D2D3 タンパク質を、全ての参照フローセルおよび試験フローセル上に 80 μ l/分で 7 分間注入した。次に、HBS-EP⁺ + BSA + ヘパリン

50

ン緩衝液を10分間流して、結合性12425を解離させた。各注入サイクル後、チップ表面は、10mMグリシンpH2を用いて、60 μ l/分で70秒間再生させた。全ての動態測定は、25℃で行った。

【0454】

12425に関するFGFR2エピトープ

FGFR2 D2/12425 Fab複合体の結晶構造を使用して、12425に関するFGFR2エピトープを同定した。結晶の非対称ユニットにおいてFGFR2 D2/12425 Fab複合体の6つのコピーが存在する（非対称ユニットは、結晶全体を再現するのに必要とされる全ての構造情報を含む）。6つ全てのコピーは、結晶充填に起因する小さな変動を除いて、12425 Fabと接触したほぼ同一の残基を共有する。6つ全てのコピーにより共有される12425接触FGFR2残基のみを使用して、エピトープを規定した。

10

【0455】

12425 FabによるFGFR2 D2上の相互作用表面は、表23および表24に詳述されるように、幾つかの不連続（即ち、非隣接）配列：即ち残基173～176、残基178、残基208～残基210、および残基212、213、217および219により形成される。これらの残基は、12425 Fabにより結合される3次元表面を形成する（図20（A））。結晶学により規定されるこのエピトープは、残基160～173、174～189および198～216を含む重水素置換質量分析法（HDx-MS）により規定されるものと十分に一致している。

20

【0456】

【表 2 3】

表23. ヒトFGFR2 D2と12425Fab重鎖(H)との間の相互作用。FGFR2残基は、P21802-3(配列番号137)に基づいて番号付けされる。Fab重鎖残基は、それらの直鎖状アミノ酸配列(配列番号139)に基づいて番号付けされる。示されるFGFR2残基は、12425Fabにおいて原子の5Å内に少なくとも1つの原子を有して、潜在的な水媒介性相互作用を担う

ヒト FGFR2		12425 Fab		
アミノ酸	番号	アミノ酸	番号	鎖
LYS	208	HIS	59	H
VAL	209	TYR	57	H
ARG	210	ALA	33	H
		VAL	50	H
		TYR	57	H
		GLU	52	H
		GLU	99	H
		SER	104	H
GLN	212	GLU	52	H
		ASP	54	H
HIS	213	GLU	52	H
		SER	104	H

【 0 4 5 7】

10

20

30

【表 2 4】

表24. ヒトFGFR D2と12425Fab軽鎖(L)との間の相互作用。FGFR2残基は、P21802-3(配列番号137)に基づいて番号付けされる。Fab軽鎖残基は、それらの直鎖状アミノ酸配列(配列番号140)に基づいて番号付けされる。示されるFGFR2残基は、12425Fabにおいて原子の5Å内に少なくとも1つの原子を有して、潜在的な水媒介性相互作用を担う。

ヒト FGFR2		12425 Fab		
残基	番号	残基	番号	鎖
ASN	173	GLN	27	L
THR	174	GLN	27	L
		TYR	92	L
VAL	175	TYR	92	L
LYS	176	ASP	32	L
		HIS	91	L
		TYR	92	L
		ASP	32	L
ARG	178	ASP	32	L
ARG	210	HIS	96	L
ILE	217	TYR	92	L
		PRO	94	L
GLU	219	SER	93	L
		PRO	94	L

【0 4 5 8】

FGFR2 D2/12425 Fab構造から、FGFR2上の潜在的なN-連結されたグリコシル化部位、即ち、Asn241およびAsn288 (Duchesne et al., (2006) J. Biol. Chem 281:27178-27189) は、12425エピトープから離れてタンパク質の反対表面上に存在し(図20(A))、FGFR2への12425結合が、グリコシル化とは無関係であることを示す。このことは、12425抗体が、類似した親和性でE. coli (E.coli) 生産(グリコシル化なし)および哺乳動物細胞生産(グリコシル化) FGFR D2-D3に結合する(データは示していない)という見解に一致している。

【0 4 5 9】

FGFR D2のLys176およびArg210は、それぞれ、12425 Fab軽鎖および重鎖と最も多く接触させる2つのエピトープ残基である。興味深いことに、Arg210は、ヘパリンに結合することが実証されており(Pellegrini et al., (2000) Nature 407:1029-1034)、これは、FGFRへのFGFR2結合、続く二量体化およびシグナル伝達を高めることができる。それと同時に、Lys176はまた、ヘパリン結合ポケットに存在すると想定される(Pellegrini et al., (2000) Nature 407:1029-1034)。これらの2つの残基のアラニンへの突然変異は、SPRアッセイにおいて12425 IgGへのFGFR2の結合を完全に消失させ(SPR法に関しては上記を参照)、これにより、12425に結合する際のそれらの重要な役割が確認され、結晶構造で観察されるエピトープが確認された。

【0 4 6 0】

12425に関するFGFR4エピトープ

FGFR4 D2／12425 Fab複合体の結晶構造を使用して、12425に関するFGFR4エピトープを同定した。結晶の非対称ユニットにおいてFGFR4 D2／12425 Fab複合体の4つのコピーが存在した。4つ全てのコピーは、結晶充填に起因する小さな変動を除いて、12425 Fabと接触したほぼ同一の残基を共有する。4つ全てのコピーにより共有される12425接触FGFR4残基のみを使用して、エピトープを規定した。

【0461】

12425 FabによるFGFR4 D2上の相互作用表面は、表25に詳述されるように、幾つかの不連続（即ち、非隣接）配列：即ち残基150～151、154、157、160、166～169、171、173～174、201～207、210および212により形成された。これらの残基は、12425 Fabにより結合される3次元表面を形成する（図20（B））。

【0462】

【表25】

表25. ヒトFGFR4 D2と12425Fab重(H)および軽(L)鎖との間の相互作用。FGFR4残基は、P22455-1(配列番号142)に基づいて番号付けされる。Fab残基は、それらの直鎖状アミノ酸配列(配列番号139および140)に基づいて番号付けされる。示されるFGFR4残基は、12425Fabにおいて原子の5Å内に少なくとも1つの原子を有して、潜在的な水媒介性相互作用を担う。

ヒト FGFR4		12425		
アミノ酸	番号	アミノ酸	番号	鎖
THR	150	TYR	102	H
HIS	151	TYR	102	H
PRO	173	TYR	102	H
ALA	174	TYR	102	H
ARG	201	TYR	57	H
		THR	58	H
		HIS	59	H
LEU	202	TYR	57	H
ARG	203	ALA	33	H
		VAL	50	H
		GLU	52	H
		TYR	57	H
		GLU	99	H
		SER	104	H
HIS	204	ASP	54	H

		SER	56	H
GLN	205	GLU	52	H
		GLY	53	H
		ASP	54	H
		SER	56	H
		TYR	57	H
		THR	101	H
		TYR	102	H
HIS	206	GLU	52	H
		GLU	99	H
		LYS	100	H
		THR	101	H
		TYR	102	H
		SER	103	H
		SER	104	H
TRP	207	TYR	102	H
GLU	212	HIS	59	H
ARG	154	SER	30	L
		SER	31	L
		ASP	32	L
		ASP	50	L
LYS	157	ASP	28	L
HIS	160	TYR	92	L
ASN	166	GLN	27	L
THR	167	ILE	2	L
		GLN	27	L
		ASP	28	L
		TYR	92	L
		SER	93	L
		PRO	94	L
VAL	168	TYR	92	L

10

20

30

40

LYS	169	ASP	32	L
		HIS	91	L
		TYR	92	L
ARG	171	SER	30	L
		ASP	32	L
		HIS	91	L
		TYR	92	L
ARG	201	PRO	94	L
ARG	203	HIS	96	L
VAL	210	TYR	92	L
		PRO	94	L
GLU	212	SER	93	L
		PRO	94	L
		SER	95	L

10

20

【0463】

FGFR2およびFGFR4上の12425エピトープの比較

FGFR2およびFGFR4上の12425エピトープは、配列およびコンホメーションの両方で非常に類似している。配列アラインメント（図20（C））で示されるように、FGFR2上の全てのエピトープ残基（破線の四角内）は、FGFR4により共有され、FGFR4中に保存される。さらに、2つの複合体構造が、12425の可変ドメイン上で重ね合わせることができる場合、2つの抗原の構造は非常に良好に重ね合わさり、FGFR2およびFGFR4への12425結合のコンホメーションが非常に類似していることを示す。このことは、両方の受容体に対する12425の交差反応性に関する構造的説明を提供する。

30

【0464】

12425結合およびFGFR二量体化

どのようにしてFGFR-FGF-ヘパリン複合体が細胞表面上で二量体化して、下流シグナル伝達を活性化するかに関して2つのモデル、即ち2:2:2モデル（FGFR:F GF:ヘパリン）（Schlessinger et al., (2000) Mol. Cell 6:743-750）、および2:2:1モデル（FGFR:F GF:ヘパリン）（Pellegrini et al., (2000) Nature 407:1029-1034）が報告されている。FGFR D2/12425 Fab複合体の結晶構造に基づいて、FGFR2および/またはFGFR4への12425の結合は、両方の二量体化モデルと調和せず、したがって両方の二量体化モデルを阻止することができた。

40

【0465】

実施例24： 製剤

ADCの臨床サービス形態（CSF）は、50mgの12425-MCC-DM1、16.2mgのコハク酸ナトリウム、410.8mgのスクロースおよび1mgのポリソルベート20を含有するバイアル中の凍結乾燥物（宣言された含量の離脱を可能にするために10%の過充填を考慮しない）である。5mLの注射用水で凍結乾燥物を再構成させた後、10mg/mLの12425-MCC-DM1、20mMのコハク酸ナトリウム、240mMのスクロースおよび0.02%のポリソルベート20、pH5.0を含有する溶液が得られる。

50

【0466】

その後の静脈内投与のために、得られた溶液を、通常、担体溶液中にさらに希釈して、輸注用のすぐに使えるADC溶液にする。

【0467】

CSFについては、予備安定性試験に基づいて、10mg/mLのADC濃度を選択した。等張性製剤を作出し、不定形の凍結乾燥ケーキ構造を維持し、タンパク質安定化を得るために、240mMのスクロース濃度を選択した。

【0468】

最も安定な製剤を選択するための重要な安定性指示分析方法は、特に、凝集レベルを決定するためのサイズ排除クロマトグラフィー、肉眼では見ることができない粒子状物質の試験、遊離毒素の決定および効力試験を包含していた。

10

【0469】

予備スクリーニング研究により、0.02%の濃度のポリソルベート20が機械的ストレスに対する十分な安定を提供することが示された。リアルタイムおよび加速安定性条件（25℃および40℃）での液体および凍結乾燥安定性研究により、pH5.0のコハク酸製剤が全体として最良の保存安定性を提供することが示された。最も顕著には、この製剤において、凝集と遊離毒素の放出との間の試験した全ての製剤の最良のバランスが満たされる。40℃で3カ月後、分解生成物の特筆すべき増加を決定することはできなかった。

【0470】

実施例25：腫瘍耐性メカニズムおよび併用療法の使用

既存の不均一性は、数多くのがんの一般的な特徴である。臨床的に有意な腫瘍（およびそれらに由来する細胞株）は、それらの初期発がん性事象から離れた多世代である。それらは、生存に関して一般的な遺伝子ドライバー病巣に必ずしも依存するとは限らない遺伝的に多様な部分集団（Nowell, Science 194: 23-28 (1976)）を獲得するのに十分な時間を有していた。これらの部分集団が、各患者において単一クローン腫瘍を処置するのではなく、継続的世代と一緒に扱われるのに十分に適合している場合、本発明者らは、事実上、複雑な集団を処置している。したがって、発がん遺伝子または腫瘍抑制因子の異なる増幅を伴うクローン集団の存在は、単一療法に対する感受性または耐性を説明することができ、標的とされる併用療法を必要とし得る。

20

30

【0471】

FGFR2発現は、FGFR2増幅SNU16細胞およびFGFR2増幅ヒト腫瘍において不均一である

FGFR2発現は、当技術分野で公知であり、かつ本明細書中に記載する方法を使用して、免疫組織化学（IHC）、フローサイトメトリーおよび／またはin situハイブリダイゼーションにおける蛍光により、SNU16細胞で測定した。親SNU16パラフィン包埋細胞ペレットのIHC染色は、広範囲のFGFR染色強度を示した。さらに、培養物中で伝播されたSNU16細胞上のFGFR2表面発現もまた、フローサイトメトリーにより測定する場合に、FGFR2に関して広範囲の発現値を示した。興味深いことに、細胞集団がEGFRに関して同時染色された場合、EGFR陽性細胞の部分集団で存在するようであった。散乱されたEGFR増幅細胞（5%未満）はまた、前処置細胞ブロック調製物中でFISHにより明白であったが、集団がqPCRにより検査される場合には、EGFR増幅は、おそらく発現の低レベルに起因して、処置前の集団では検出することができなかった。

40

【0472】

296個のヒト胃腫瘍が、qPCRにより評価され、7個（2.4%）が、FGFR2コピー数の増加を有することがわかった（例えば、およそ4の遺伝子コピー数）。最高のFGFR2コピー数を有する一連の試料からの9個の試料に対するIHC染色により、各試料が、FGFR2発現に関して、陽性である腫瘍領域、および陰性である領域を有することが明らかとなった。免疫反応性は、任意の特異的な腫瘍形態と相関しなかった。腫瘍

50

試料が、連続切片上のマスクとしてF G F R 2免疫反応性を使用して顕微解剖された場合、これらのF G F R 2陽性および陰性領域からのDNAは、9個全ての場合で、それぞれ、F G F R 2遺伝子増幅または非増幅と相関した。F G F R 2の過剰発現および増幅の相関は、以下に示すようにディープシーケンシングにより確認された。

【0473】

E G F Rは、B G J 3 9 8に耐性であるS N U 1 6細胞において過剰発現および増幅され、F G F R 2発現および増幅は損失される

S N U 1 6細胞（A C C T C R L - 5 9 7 4）を、R P M I - 1 6 4 0培地+10% F B S（A T C C C a t # 3 0 - 2 0 0 1）を有する0.5 μ MのB G J 3 9 8中で培養して、続いてB G J 3 9 8濃度を0.5 μ M~1.0 μ M~2.5 μ M~5.0 μ Mへ増加させた。培地を変更して、新鮮なB G J 3 9 8（5 μ M）を、1週に1度、6週間添加した。細胞を、回収細胞培養凍結培地（G I B C O（登録商標）# 1 2 6 4 8 - 1 0 1）中で凍結させて、R P M I - 1 6 4 0 + 1 0 % F B S中で再構成した。続いて、耐性細胞株の解凍した継代を、1 μ M B G J 3 9 8選択のもとで維持した。B G J 3 9 8による選択のもと培養物中で保持されるS N U 1 6細胞は、それぞれ、感受性細胞から耐性細胞において、1.7 nMから2.4 μ Mまで増加するI C₅₀で、最終的には成長阻害に対してあまり感受性ではなくなった。

【0474】

B G J 3 9 8耐性S N U 1 6細胞のウェスタンブロット解析により、耐性細胞集団がF G F R 2の発現を損失しており、もはやp - F R S 2を通じてシグナル伝達していないことが示され、F G F R 2シグナル伝達経路がもはや活性ではないことを示した。それどころか、耐性集団は、高レベルのE G F Rおよびp E G F Rを発現し、細胞が代わってE G F R経路を通じてシグナル伝達していることを示した。B G J 3 9 8耐性S N U 1 6細胞はまた、q P C Rにより測定される場合に、E G F R DNAコピー数の増加も示し、これは、前処置したS N U 1 6細胞と比較して、タンパク質発現の増加と相関する。B G J 3 9 8耐性細胞は、成長し続ける（但し、親（未処置）細胞株よりも遅い成長速度で、親S N U 1 6細胞に関する36時間と比較して125時間の倍加時間で）。

【0475】

S N U 1 6細胞におけるB G J 3 9 8耐性の始まりは、E G F R阻害剤ゲフィチニブに対する後天的感受性をもたらす（図21）。S N U 1 6親およびB G J 3 9 8耐性細胞に対して行われた細胞成長アッセイは、それぞれ10 μ Mを上回って16.7 nMまでのゲフィチニブI C₅₀におけるシフトを示し、F G F R 2からE G F Rへの発がん遺伝子依存性の切り換えを確認した。

【0476】

本発明者らは、トランスフォーミング発がん遺伝子F G F R 2で増幅される細胞株が、第2の発がん遺伝子E G F Rで増幅され、かつそれに依存する既存の細胞を含有することを示してきた。F G F R 2増幅細胞株S N U 1 6が、F G F Rキナーゼ阻害剤により圧力下に置かれた場合、1つの集団が排除され、部分集団が優性となった。本発明者らは、不均一な腫瘍が、標的療法のような選択圧下に置かれる場合に、部分集団の成長が好都合となり、臨床的耐性をもたらし得ると予測する。

【0477】

ディープシーケンシングは、ヒト胃がん検体におけるさらなる発がん性病巣の既存を明らかにする

F G F R 2を過剰発現する腫瘍領域およびF G F R 2過剰発現を伴わない腫瘍領域から採取した対での腫瘍試料の顕微解剖した領域のディープシーケンシングは、F G F R 2増幅との相関を示した。F G F R 2過剰発現を有する腫瘍領域は全て、コピー数におけるF G F R 2増幅（例えば、コピー数6~16）を示した一方で、F G F R 2過剰発現を伴わない腫瘍領域は、F G F R 2コピー数増幅を示さなかった。上述のS N U 1 6における見解と一致して、1つの腫瘍は、非F G F R 2増幅領域においてのみE G F R増幅を示した。E G F R増幅は、この検体ではk r a s増幅と同時発生であった。この観察は、k r a

10

20

30

40

50

s 増幅が抗 E G F R 療法で処置したがんにおける耐性のメカニズムであることを示唆するこれまでの報告と一致している (Valtorta, et al., IJC (2013) 133:1259-1266; Misale, et al., Nature (2012) 486:532-538)。

【0478】

他の腫瘍は、代替的な受容体チロシンキナーゼの増幅を示した。例えば、1つの腫瘍対は、F G F R 2 増幅領域および F G F R 2 非増幅領域の両方で増幅される H e r 2 を有した一方で、さらなる腫瘍は、非 F G F R 2 増幅領域においてのみ同定される I G F 1 R 増幅を有した。全ての腫瘍における領域は全て、p 5 3 において突然変異を有するようであった。幾つかのさらなる突然変異が同定されたが、試料セットにわたって首尾一貫しては見いだされなかった。初期に蔓延していない受容体チロシンキナーゼで増幅されたこれらの小さな既存集団は、標的療法（例えば、抗 F G F R 2 療法）のような選択圧が印加される場合に、耐性細胞の供給源であり得る。

10

【0479】

本発明者らはまた、F G F R 2 増幅を有する原発性ヒト腫瘍が、他のチロシンキナーゼの増幅を有する部分集団を含有すること、およびこの部分集団増幅が、場合によっては F G F R 2 増幅を有さない腫瘍領域で起きることを実証してきた。他の研究 (Snuderl, et al. (2011) Cancer Cell 20: 810-817) を連想して、全ての腫瘍領域はまた、一般的な突然変異、この場合では p 5 3 における突然変異を含有し、全体として腫瘍に関する共通母細胞 (ancestor) を示唆した。

【0480】

20

H e r 2 発現性腫瘍における耐性メカニズムとしての F G F R 2

F G F R 2 の増幅は、ラパチニブによる処置後の乳がん細胞における耐性メカニズムとして提唱されており (Azuma, et al. (2011) Biochem Biophys Res Comm, 407:219-224)、F G F R 2 発現は、ラパチニブに対して乏しい応答を有する乳がん患者において過剰発現されるとみなされた。本発明者らは、ディープシーケンシングによりヒト H e r 2 増幅胃腫瘍試料が、F G F R 2 増幅細胞の既存の部分集団を有することを実証してきた (Deeds et al., United States and Canadian Academy of Pathology, March 2014: Abstract no: 453290)。これにより、F G F R 2 増幅が、抗 H e r 2 療法後に他の H e r 2 増幅腫瘍において耐性メカニズムを表し得ることが示唆される。したがって、F G F R 2 療法、例えば本明細書中に記載する F G F R 2 抗体および A D C と組み合わせた H e r 2 療法の処置は、H e r 2 発現性がんおよび／または H e r 2 耐性がんの処置に有用である。

30

【0481】

これらのデータは、F G F R 2 療法、例えば本明細書中に記載する F G F R 2 A D C が、がんの処置に関して他のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせて有用であり得ることを示唆した。さらに、本明細書中に記載する F G F R 2 A D C は、他のチロシンキナーゼ阻害剤（例えば、H e r 2 阻害剤、H e r 3 阻害剤、E G F R 阻害剤、M e t 阻害剤および I G F R 阻害剤）を含む他のがん療法に対して耐性の患者集団の処置に有用であり得る。

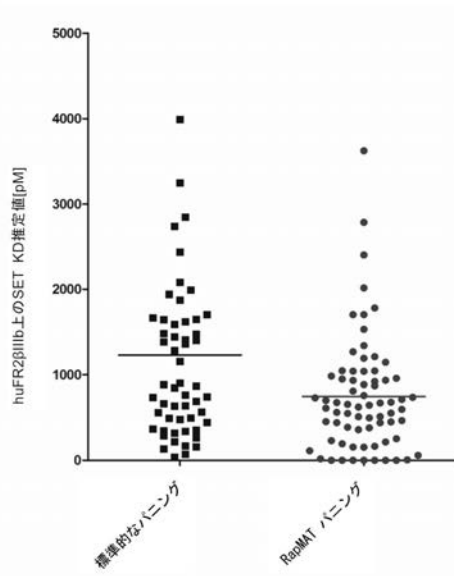
【0482】

本明細書に記載の実施例および実施形態は例示目的に過ぎず、それに照らして様々な改変または変更が当業者に対して示唆され、本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲の中に含まれることが理解される。

40

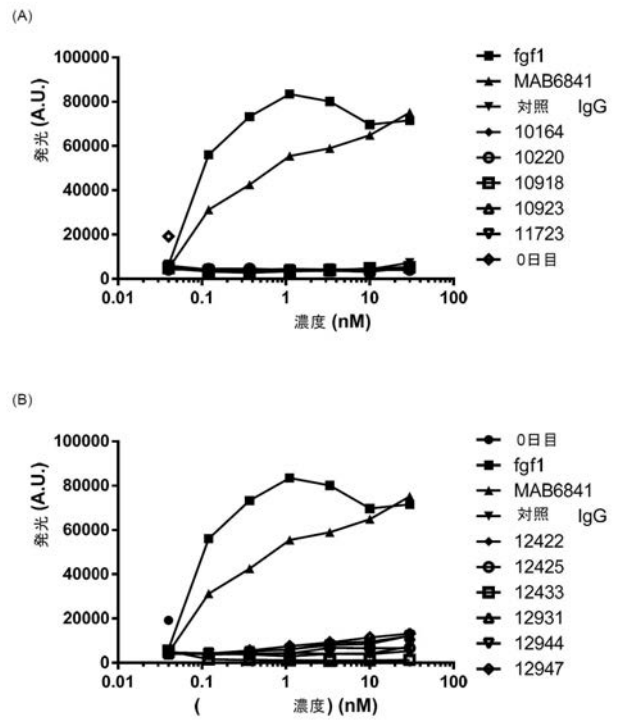
【図 1】

図1



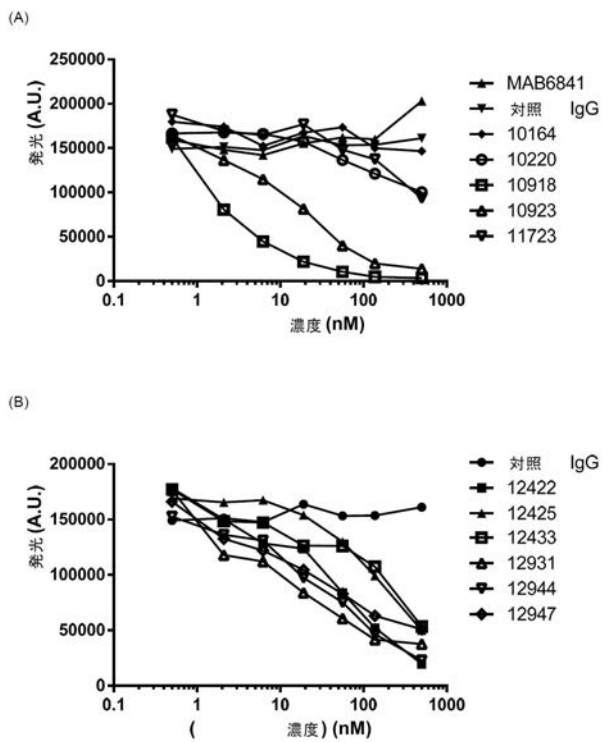
【図 2】

図2



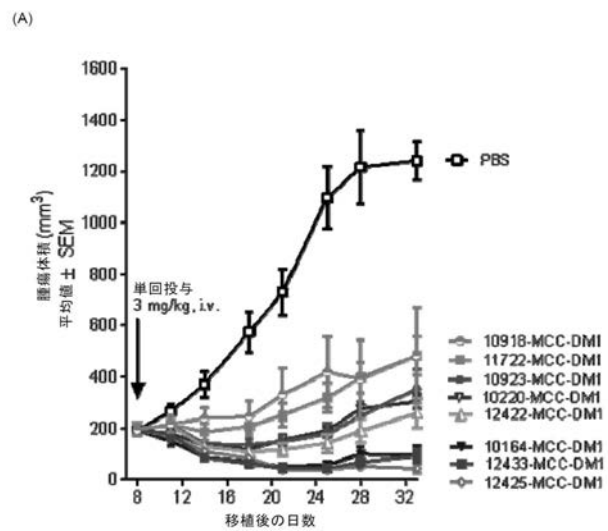
【図 3】

図3



【図 4 - 1】

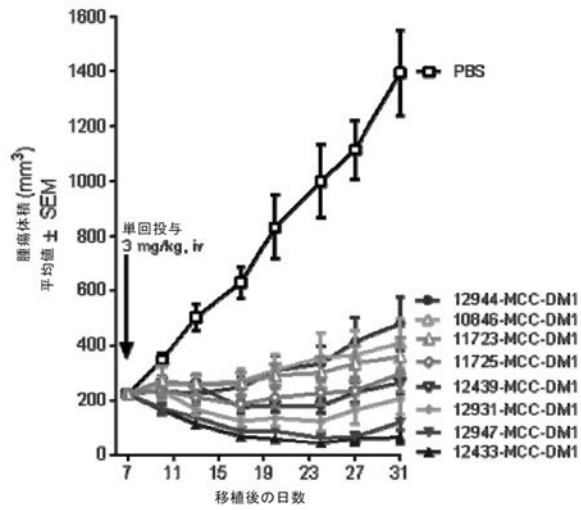
図4



【図 4 - 2】

図4

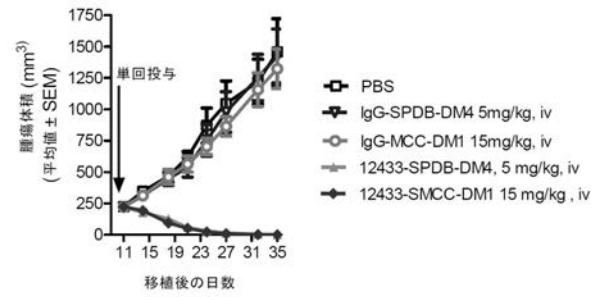
(B)



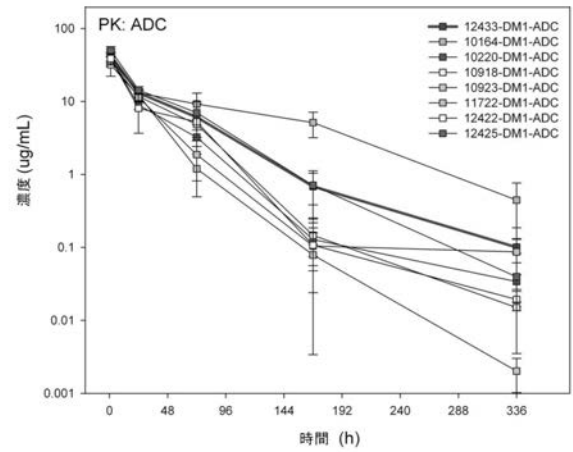
【図 4 - 3】

図4

(C)



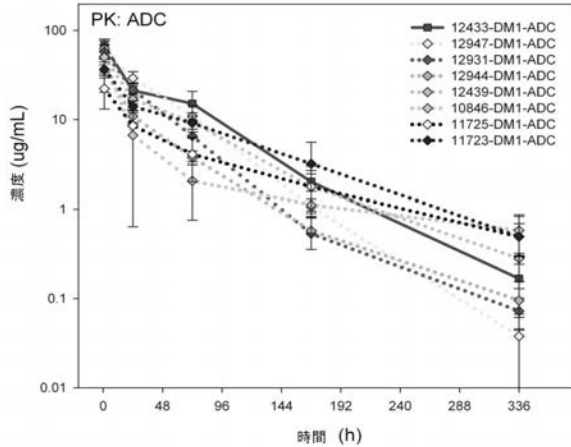
(D)



【図 4 - 4】

図4

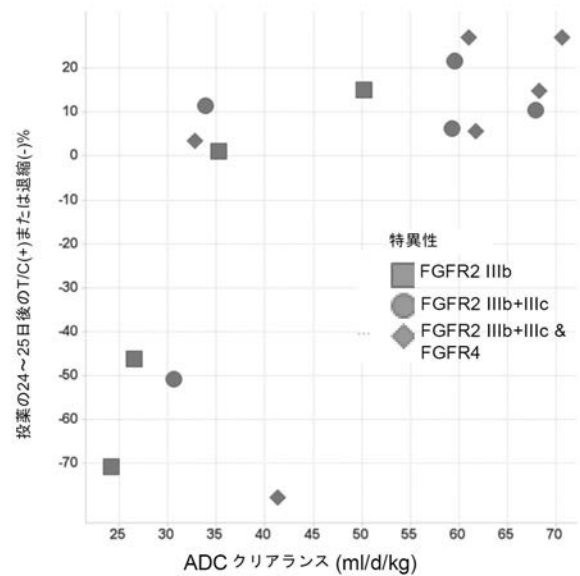
(E)



【図 4 - 5】

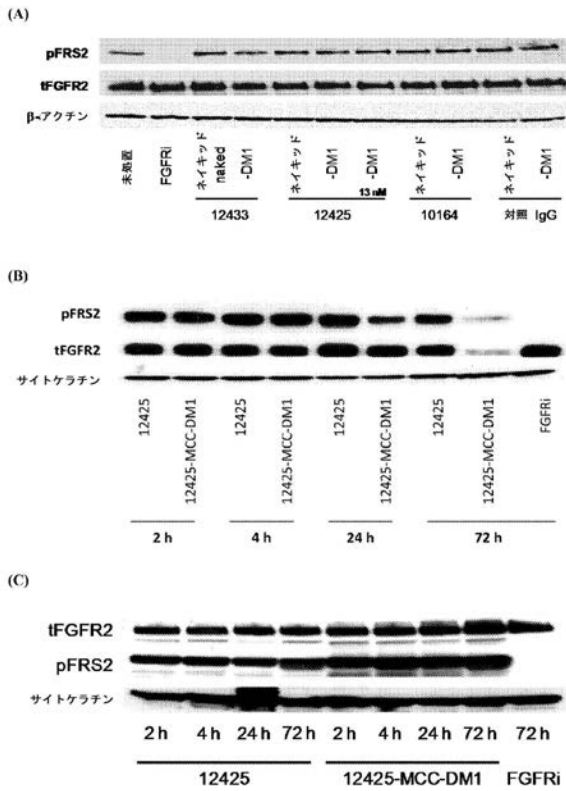
図4

(F)



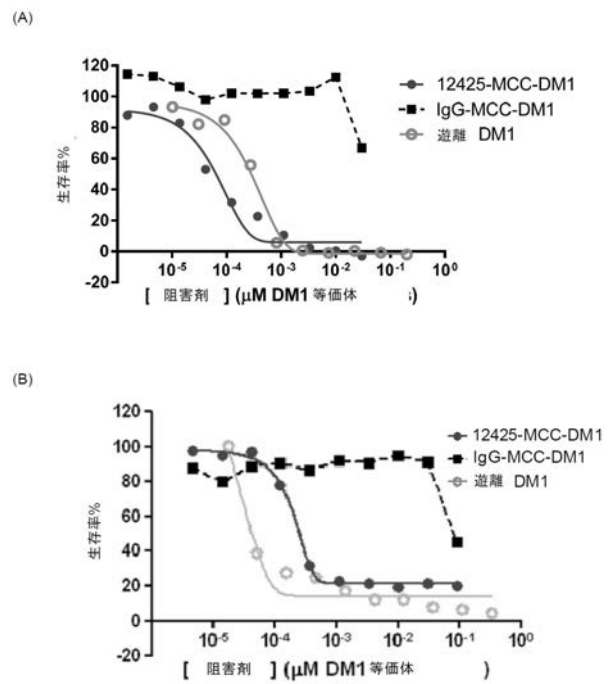
【図 5】

図 5



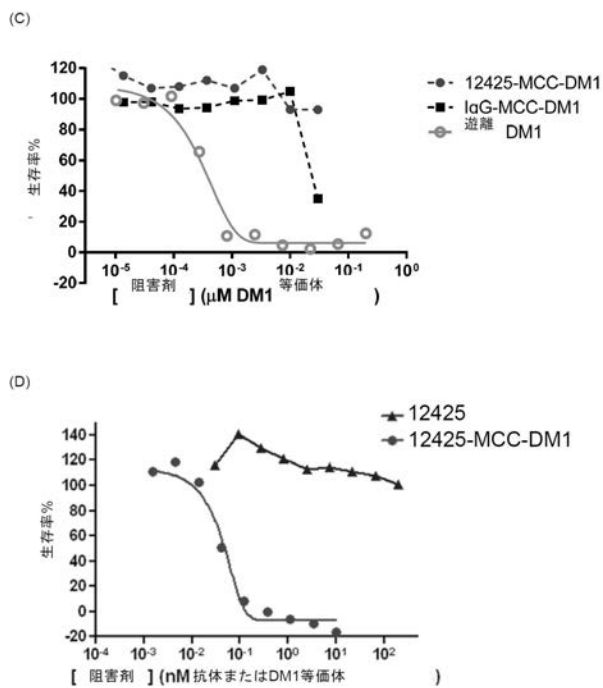
【図 6 - 1】

図 6



【図 6 - 2】

図 6



【図 7 - 1】

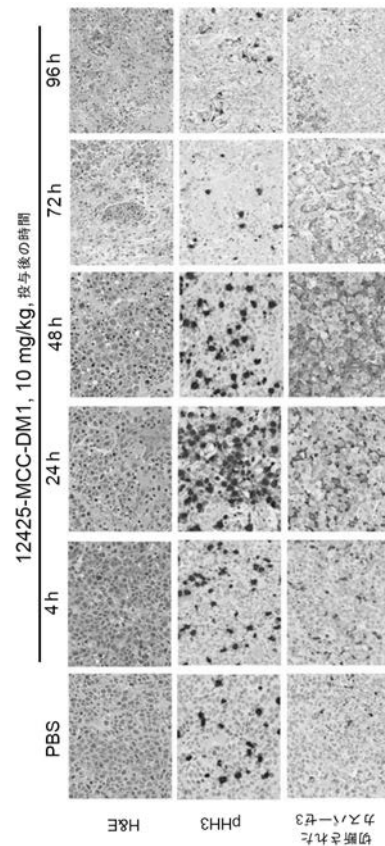


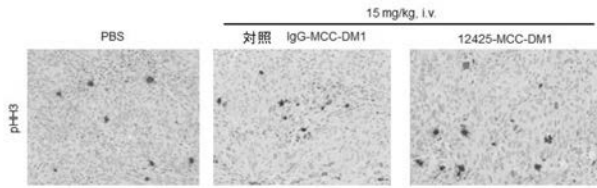
図 7

(A)

【図 7 - 2】

図 7

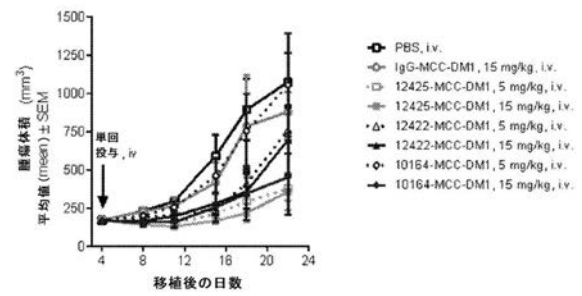
(B)



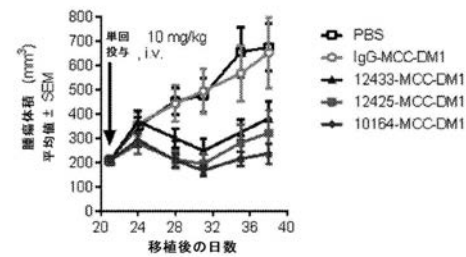
【図 8 - 1】

図 8

(A)



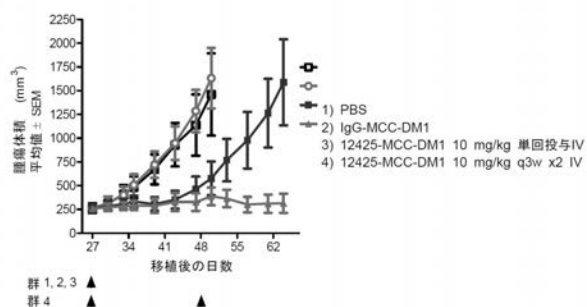
(B)



【図 8 - 2】

図 8

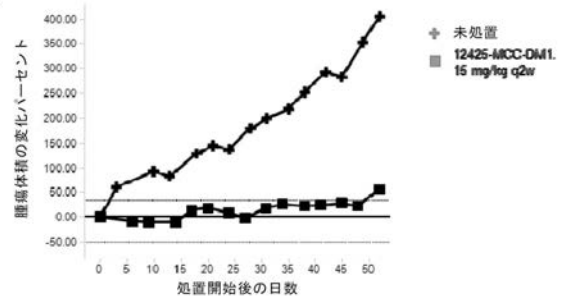
(C)



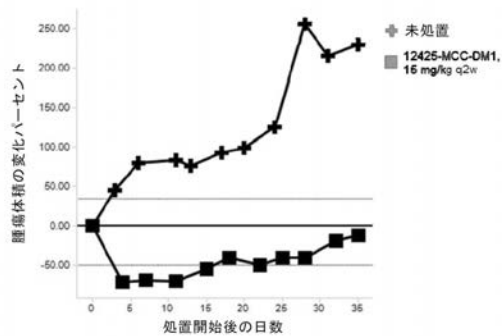
【図 8 - 3】

図 8

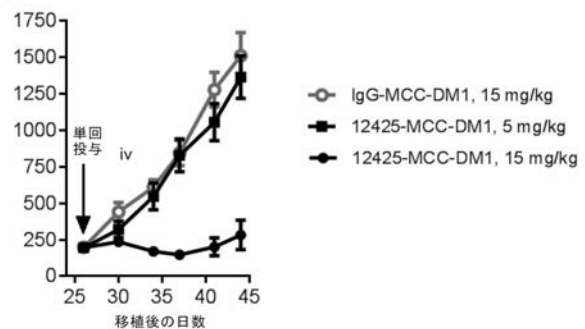
(E)



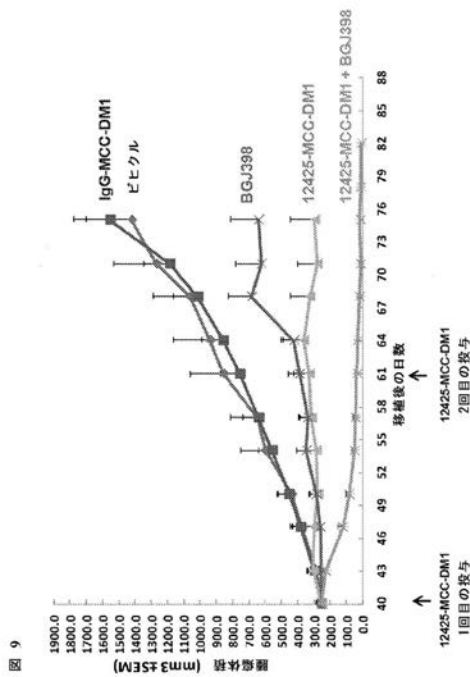
(D)



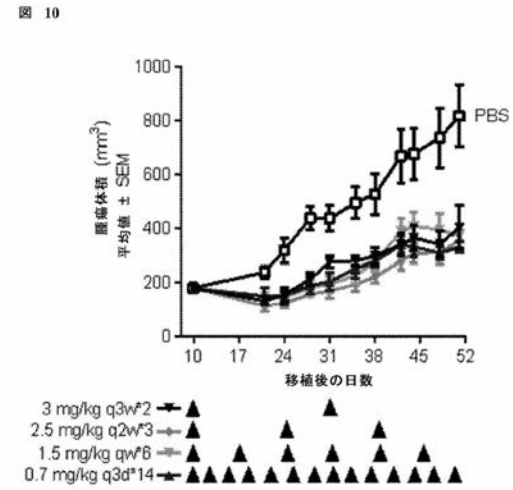
(F)



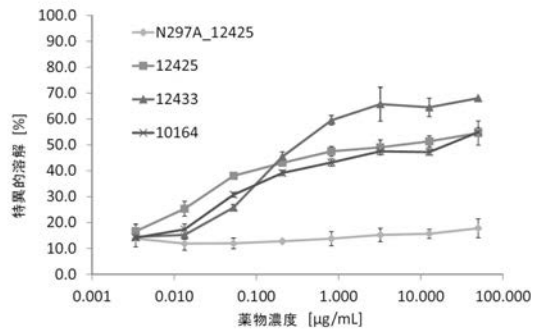
【図 9】



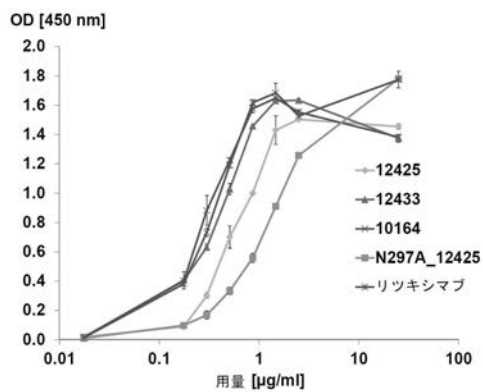
【図 10】



【図 11-1】

図11
(A)

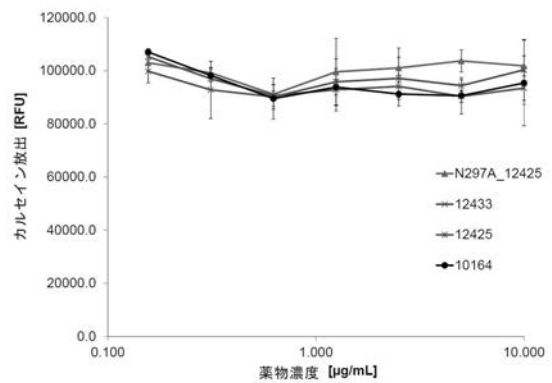
(B)



【図 11-2】

図11

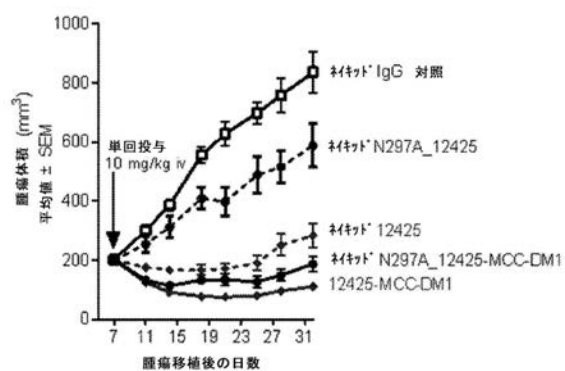
(C)



【图 11-3】

图 11

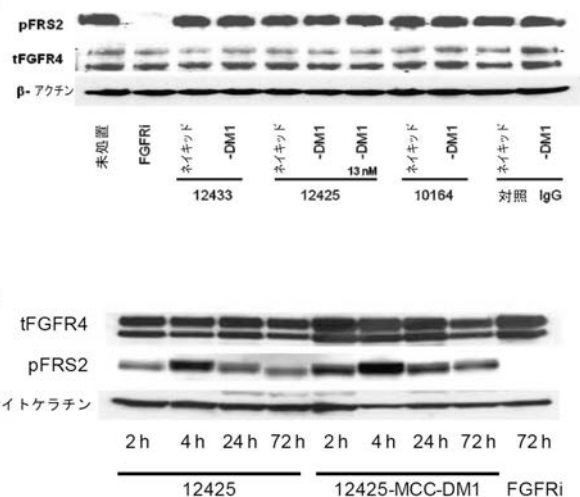
(D)



【图 1 2】

图 12

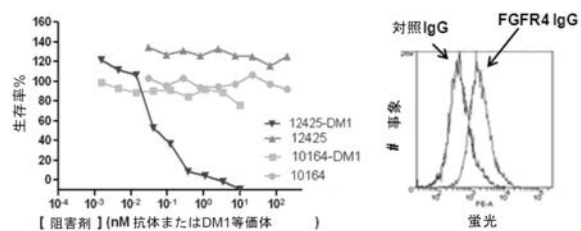
(A)



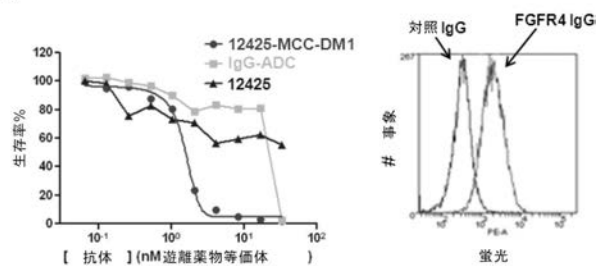
【図 1 3 - 1】

图13

(A)



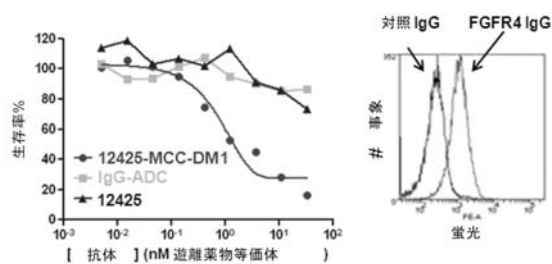
(B)



【図 1 3 - 2】

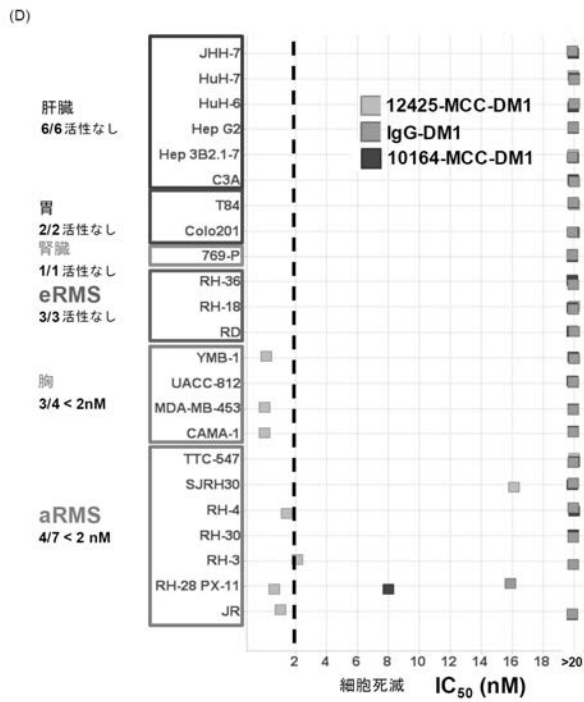
图 13

(C)



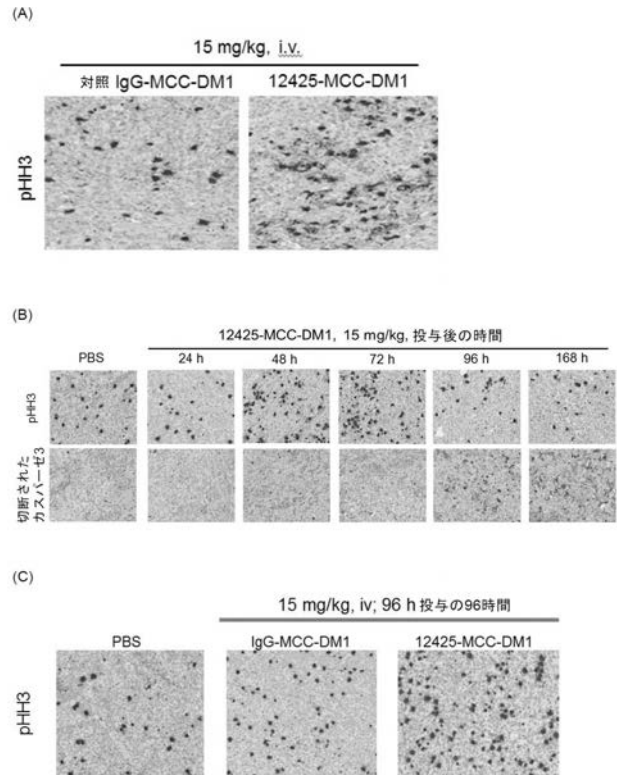
【図 13 - 3】

図 13



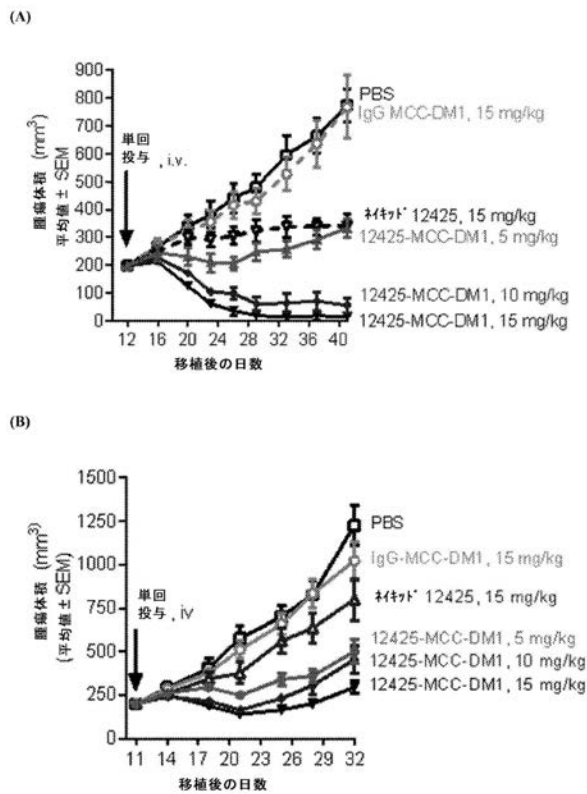
【図 14】

図 14



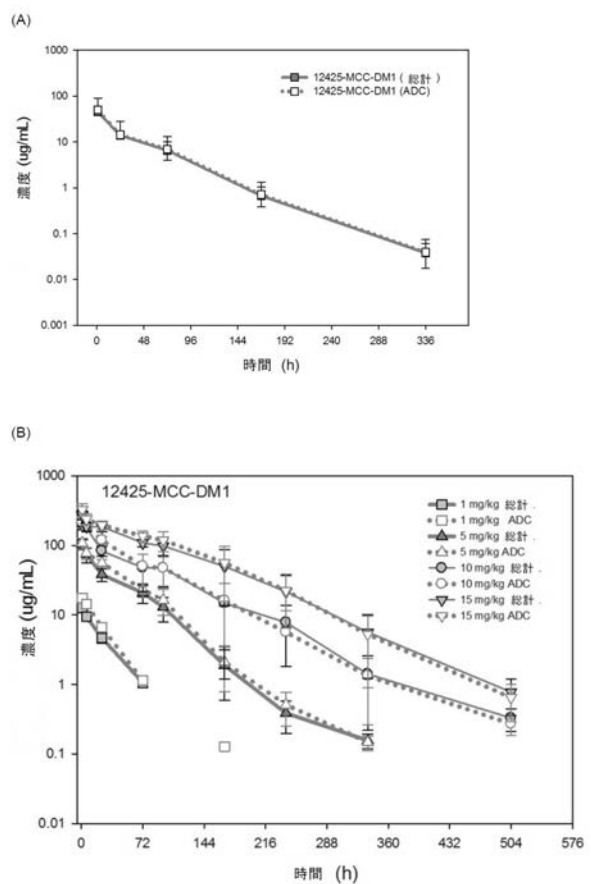
【図 15】

図 15

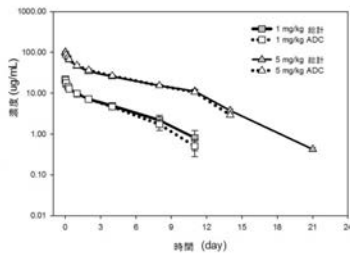


【図 16 - 1】

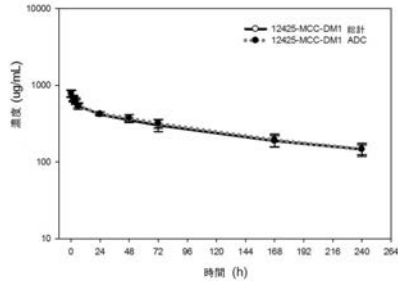
図 16



【図 16 - 2】

図 16
(C)

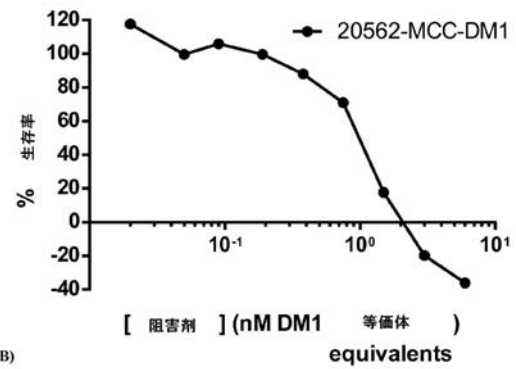
(D)



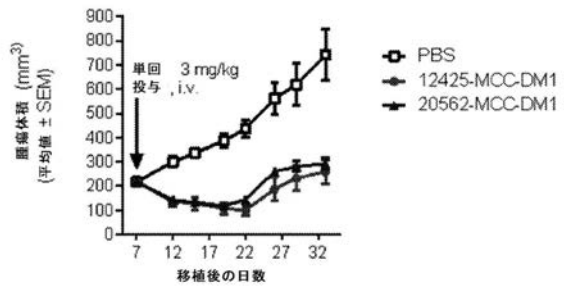
【図 17】

図 17

(A)



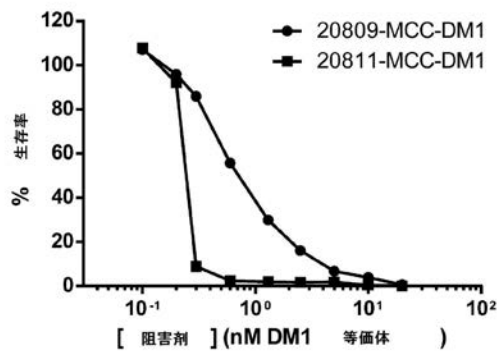
(B)



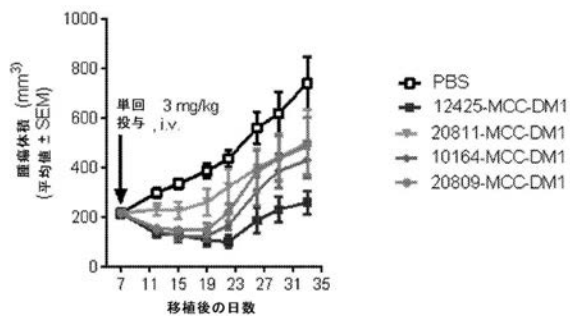
【図 18】

図 18

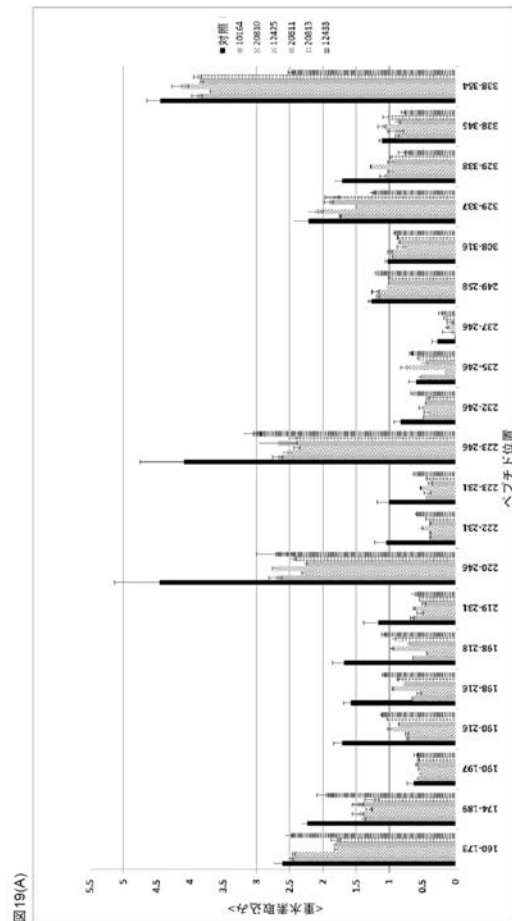
(A)



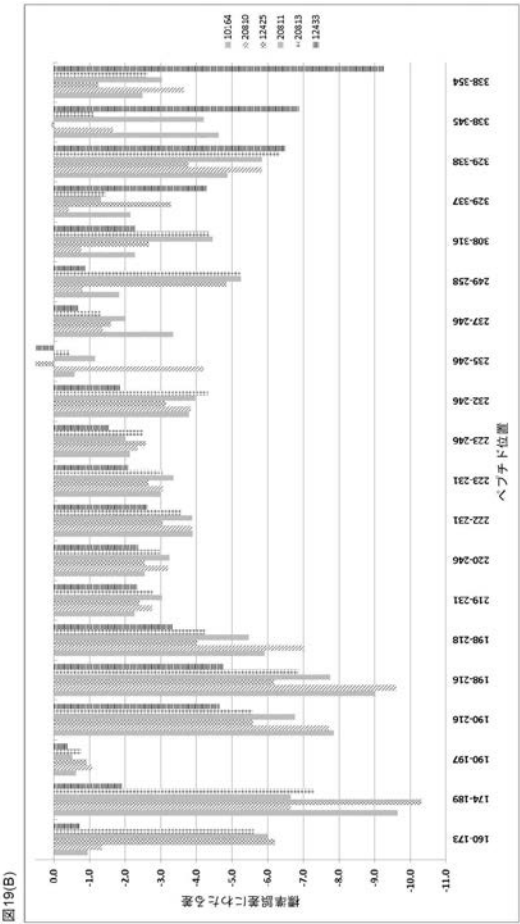
(B)



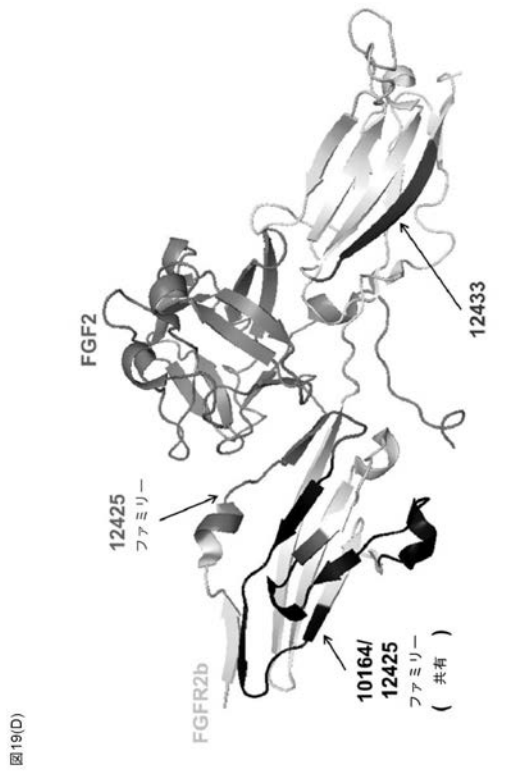
【図 19 - 1】



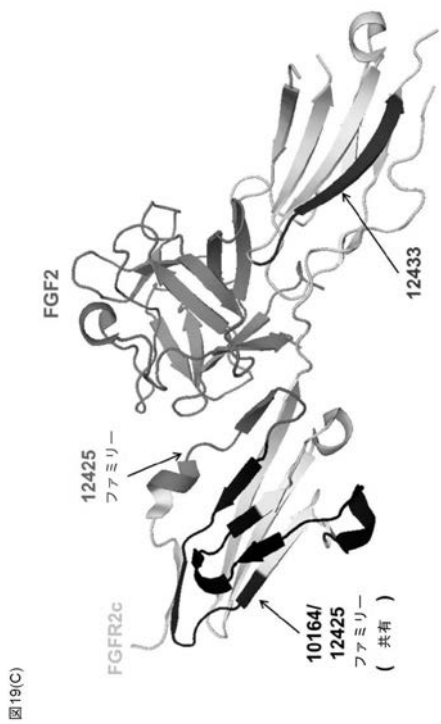
【図 19 - 2】



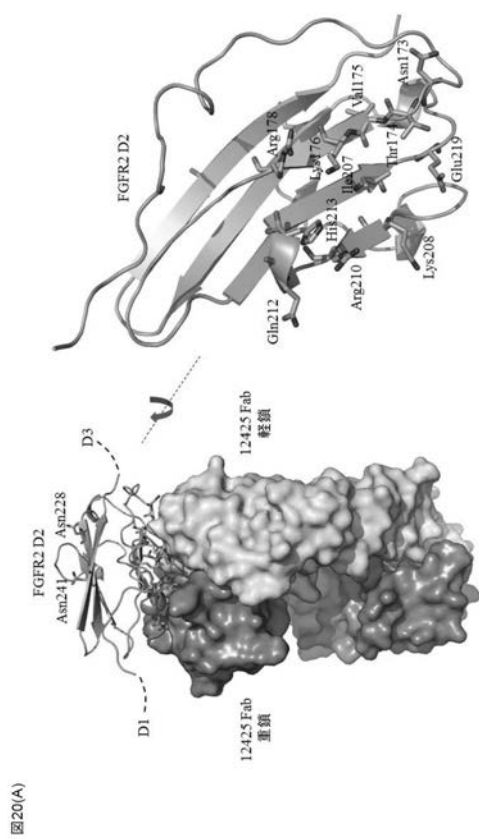
【図 19 - 4】



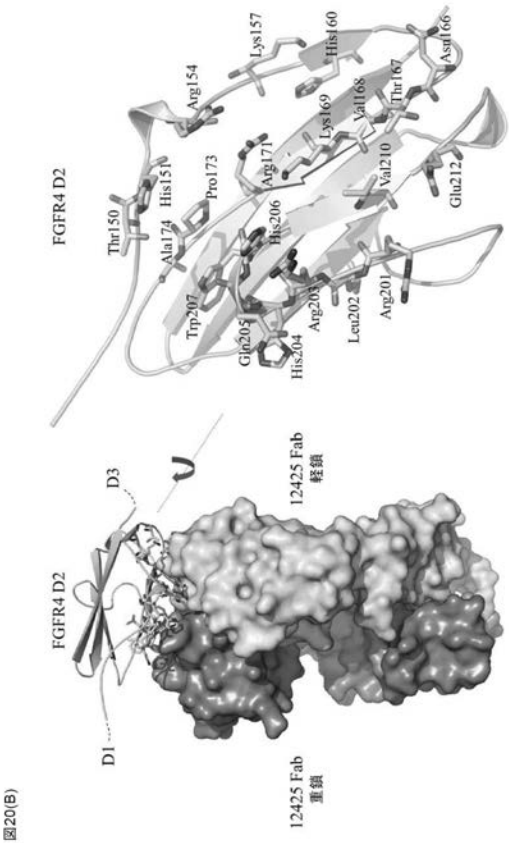
【図 19 - 3】



【図 20 - 1】



【図 20-2】

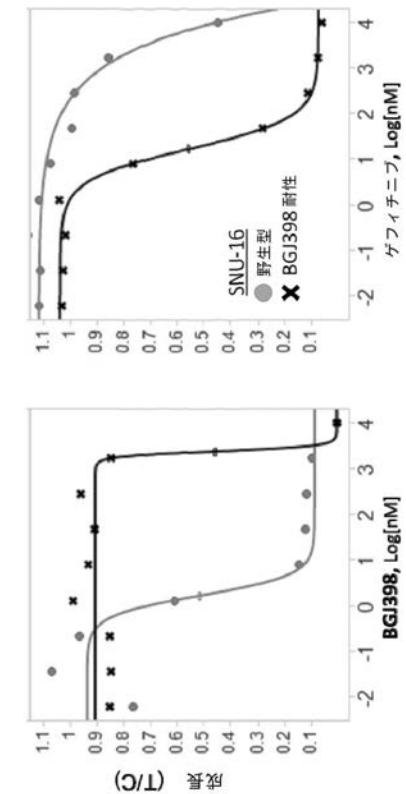


【図 20-3】

Figure 20(C) shows the amino acid sequence of the FGFR4 D2 domain and the 12425 Fab antibody. The sequence is shown in a table format, with the amino acid sequence of the FGFR4 D2 domain and the 12425 Fab antibody. The sequence is shown in a table format, with the amino acid sequence of the FGFR4 D2 domain and the 12425 Fab antibody.

150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
FGFR2	NSNN	KRPYWT	NTT	MEK	LHAYPA	ANTVK	FRCPC	GNP	PTMRW
FGFR4	HSVP	OCAPYWT	HP	MEK	LHAYPA	GNTVK	FRCPC	GNP	PTIRWL
FGFR2	FKQ	EHRI	GGY	RR	QHWSL	MESVVP	SD	GN	YTC
FGFR4	PH	ENR	IGGI	RR	QHWSL	MESVVP	SD	GN	YTC

【図 21】



【配列表】

2016518332000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/025944

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K16/28 C07K16/46
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PASCAL, CHEM ABS Data, DISSERTATION ABS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/148928 A1 (GALAXY BIOTECH LLC [US]; KIM KYUNG JIN [US]; WANG LIHONG [US]; PARK HA) 10 December 2009 (2009-12-10)	45-66
Y	examples 2,7 claims 5,11-21	1-35, 38-44, 67,68
X	----- WO 2011/066503 A2 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; DENNIS MARK [US]; POLAKIS) 3 June 2011 (2011-06-03) examples claim 27 sequence 80 ----- -/-	1-35, 38-68



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 August 2014

Date of mailing of the international search report

19/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, Anwyn

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/025944**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-35, 40-68(completely); 38, 39(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2014/025944

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-35, 40-68(completely); 38, 39(partially)

Antibodies against both FGFR2 and FGFR4, and their conjugates.

1.1. claims: 1-35, 40-44, 67, 68(completely); 38, 39(partially)

Conjugates of antibodies against both FGFR2 and FGFR4 as defined in these claims, their use in a method of treating cancer, and the method for their preparation.

1.2. claims: 45-66

Antibodies against both FGFR2 and FGFR4, nucleic acid encoding them, the vector containing this nucleic acid, the host cell expressing it, and the process for producing the antibodies as defined in these claims.

2. claims: 36, 37(completely); 38, 39(partially)

Method of treating cancer using a conjugate of an antibody against both FGFR2 and FGFR4 with a cytotoxic agent as defined, in combination with a further compound as defined in present claim 36

3. claims: 69, 70

Diagnostic reagent as defined in these claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/025944

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/260748 A1 (ELKINS KRISTI [US] ET AL) 14 October 2010 (2010-10-14) examples 2-3 figure 12 sequence 42	1-35, 38-68
X	----- JOHNSTON ET AL: "Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs) Localize in Different Cellular Compartments: A SPLICE VARIANT OF FGFR-3 LOCALIZES TO THE NUCLEUS", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 51, 22 December 1995 (1995-12-22), pages 30643-30650, XP055135615, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.270.51.30643	45-66
Y	abstract page 30648, left-hand column	1-35, 38-44, 67,68
X	----- WU S-L ET AL: "An approach to the proteomic analysis of a breast cancer cell line (SKBR-3)", PROTEOMICS, vol. 3, no. 6, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 1037-1046, XP002345281, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/PMIC.200300382	45-66
Y	abstract page 1044, right-hand column, paragraph 2	1-35, 38-44, 67,68
X	----- WO 2005/066211 A2 (FIVE PRIME THERAPEUTICS INC [US]; ZENG CHANGJIANG [US]; HESTIR KEVIN []) 21 July 2005 (2005-07-21)	45-66
Y	examples	1-35, 38-44, 67,68
X	----- WO 2009/100105 A2 (ATTOGEN INC [US]; CHANG XIAO-JIA [US]; SCHWERTSCHLAG ULLRICH S [US]) 13 August 2009 (2009-08-13)	45-66
Y	examples 1,1.6,2,5,5.3,5.4	1-35, 38-44, 67,68
Y	----- WO 2010/126551 A1 (IMMUNOGEN INC [US]; SINGH RAJEEVA [US]; KOVTUN YELENA [US]; WILHELM SH) 4 November 2010 (2010-11-04)	1-35, 38-44, 67,68
	examples claims ----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/025944

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/274713 A1 (CHARI RAVI V J [US] ET AL) 5 November 2009 (2009-11-05) cited in the application examples	1-35, 38-44, 67,68
Y	----- WO 2005/037992 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; STEEVES RITA [US]; LUTZ ROBERT [US]; CHARI RAVI [U] 28 April 2005 (2005-04-28) examples claims	1-35, 38-44, 67,68
Y	----- WO 2006/113623 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; GOLDBAKHER VIKTOR S [US]; LUTZ ROBERT J [US]; CHAR) 26 October 2006 (2006-10-26) examples	1-35, 38-44, 67,68
E	----- WO 2014/089193 A1 (AVEO PHARMACEUTICALS INC [US]) 12 June 2014 (2014-06-12) tables 8-11 -----	45-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/025944

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009148928 A1	10-12-2009	AU 2009255305 A1	10-12-2009
		CA 2725873 A1	10-12-2009
		CN 102046803 A	04-05-2011
		EP 2288717 A1	02-03-2011
		JP 2011521966 A	28-07-2011
		KR 20110011710 A	08-02-2011
		US 2009304707 A1	10-12-2009
		US 2013209482 A1	15-08-2013
		WO 2009148928 A1	10-12-2009
WO 2011066503 A2	03-06-2011	AR 079217 A1	04-01-2012
		AU 2010324686 A1	28-06-2012
		CA 2781887 A1	03-06-2011
		CN 102741294 A	17-10-2012
		CN 103724432 A	16-04-2014
		CN 103755809 A	30-04-2014
		CO 6551727 A2	31-10-2012
		CR 20120354 A	11-09-2012
		EP 2507264 A2	10-10-2012
		JP 2013511993 A	11-04-2013
		KR 20120116426 A	22-10-2012
		MA 33839 B1	03-12-2012
		NZ 599707 A	25-07-2014
		PE 15842012 A1	29-11-2012
		RU 2012127351 A	27-01-2014
		TW 201124531 A	16-07-2011
		TW 201428099 A	16-07-2014
		US 2011137016 A1	09-06-2011
		US 2014079721 A1	20-03-2014
		US 2014080152 A1	20-03-2014
		WO 2011066503 A2	03-06-2011
US 2010260748 A1	14-10-2010	AR 076029 A1	11-05-2011
		AU 2010236787 A1	10-11-2011
		CA 2757382 A1	21-10-2010
		CN 102471380 A	23-05-2012
		CO 6430468 A2	30-04-2012
		CR 20110558 A	07-12-2011
		EC SP11011436 A	30-12-2011
		EP 2414399 A1	08-02-2012
		JP 2012522512 A	27-09-2012
		KR 20120057565 A	05-06-2012
		MA 33256 B1	02-05-2012
		NZ 595574 A	29-11-2013
		PE 08782012 A1	06-08-2012
		RU 2011144141 A	10-05-2013
		SG 174992 A1	28-11-2011
		TW 201038286 A	01-11-2010
		US 2010260748 A1	14-10-2010
		US 2013089555 A1	11-04-2013
		US 2014106374 A1	17-04-2014
		WO 2010120561 A1	21-10-2010
WO 2005066211 A2	21-07-2005	AU 2004312376 A1	21-07-2005
		CA 2550245 A1	21-07-2005
		EP 1697420 A2	06-09-2006
		US 2007248605 A1	25-10-2007
		WO 2005066211 A2	21-07-2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/025944

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009100105 A2	13-08-2009	US 2011059091 A1 WO 2009100105 A2	10-03-2011 13-08-2009
WO 2010126551 A1	04-11-2010	CN 102596922 A EP 2486023 A1 JP 2013506709 A KR 20120080611 A WO 2010126551 A1	18-07-2012 15-08-2012 28-02-2013 17-07-2012 04-11-2010
US 2009274713 A1	05-11-2009	AU 2009243010 A1 CA 2722696 A1 CN 102076717 A EP 2281006 A1 JP 2011519864 A KR 20110004889 A NZ 588884 A RU 2010148743 A SG 189811 A1 US 2009274713 A1 US 2013011419 A1 US 2014178416 A1 WO 2009134977 A1	05-11-2009 05-11-2009 25-05-2011 09-02-2011 14-07-2011 14-01-2011 31-05-2013 10-06-2012 31-05-2013 05-11-2009 10-01-2013 26-06-2014 05-11-2009
WO 2005037992 A2	28-04-2005	AU 2004282491 A1 AU 2010212291 A1 BR P10415448 A CA 2542128 A1 CN 103223174 A DK 1689846 T3 EA 200600752 A1 EC SP066461 A EP 1689846 A2 EP 2596803 A2 EP 2596804 A2 EP 2612682 A2 ES 2404304 T3 HR P20130412 T1 JP 2007520450 A JP 2012006928 A JP 2014177463 A KR 20060130552 A KR 20120034800 A KR 20130102649 A KR 20140033003 A LU 92336 I2 NZ 545195 A NZ 583844 A PT 1689846 E SI 1689846 T1 US 2005169933 A1 US 2008114153 A1 US 2008145374 A1 US 2008171856 A1 US 2008171865 A1 US 2011281856 A1 US 2012226025 A1 US 2014154804 A1	28-04-2005 02-09-2010 05-12-2006 28-04-2005 31-07-2013 06-05-2013 31-08-2007 30-05-2007 16-08-2006 29-05-2013 29-05-2013 10-07-2013 27-05-2013 30-06-2013 26-07-2007 12-01-2012 25-09-2014 19-12-2006 12-04-2012 17-09-2013 17-03-2014 17-02-2014 30-07-2010 30-06-2011 08-05-2013 28-06-2013 04-08-2005 15-05-2008 19-06-2008 17-07-2008 17-07-2008 17-11-2011 06-09-2012 05-06-2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/025944

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2005037992 A2	28-04-2005
-----	-----	-----	-----
WO 2006113623 A2	26-10-2006	AU 2006236489 A1	26-10-2006
		BR P10608175 A2	10-11-2009
		CA 2618721 A1	26-10-2006
		CN 102603770 A	25-07-2012
		CR 9518 A	11-08-2008
		EA 200702239 A1	30-10-2008
		EP 1868649 A2	26-12-2007
		IL 186535 A	29-03-2012
		JP 2008538365 A	23-10-2008
		KR 20070120156 A	21-12-2007
		US 2006233814 A1	19-10-2006
		US 2009076263 A1	19-03-2009
		US 2011319612 A1	29-12-2011
		WO 2006113623 A2	26-10-2006
-----	-----	-----	-----
WO 2014089193 A1	12-06-2014	NONE	
-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 C 0 8 6	
C 0 7 K	1/10	(2006.01)	C 0 7 K	1/10	4 H 0 4 5	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L	
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/48		
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	47/22		
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/537		
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/02	A	
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	A	
A 6 1 K	31/506	(2006.01)	A 6 1 K	9/19		
			A 6 1 K	31/506		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (72)発明者 エッテンバーグ, セス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アヴェニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド
- (72)発明者 ホーブスト, ニコル
ドイツ国 プラネック 8 2 1 5 2, レナークライストーストラッセ 4 8, モルフォシス アーゲー
- (72)発明者 フー, ティアンセン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アヴェニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド
- (72)発明者 ジェンキンス, デヴィッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 4 1, カーライル, エスタブルック ロード 1 4 9
- (72)発明者 トクソ, エンギン
ドイツ国 プラネック 8 2 1 5 2, レナークライストーストラッセ 4 8, モルフォシス アーゲー
- (72)発明者 モシャー, レベッカ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アヴェニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド
- (72)発明者 メイヤー, マシュー ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アヴェニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, イン
コーポレーテッド

(72)発明者 ペトロプロス, コンスタンティン

ドイツ国 プラネック 8 2 1 5 2, レナークライストーストラッセ 4 8, モルフォシス アー
ゲー

(72)発明者 バット, デヴィッド ブライアント

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 7 8, ウェイランド, キャンベル ロード 3 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA42 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 EA04
GA11 HA08
4B064 AG26 AG27 CA05 CA06 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA25
CA44
4C076 AA95 CC41 DD42 DD59 DD60 EE23 EE59 FF68
4C084 AA19 MA44 NA13 NA14 ZB26 ZC20 ZC75
4C085 AA14 AA26 CC23 EE01 EE03 HH03 HH07 HH13 KA04 KA27
KA28 KA29 KB82 LL18
4C086 AA01 AA02 AA10 BC50 CB22 GA07 MA01 MA02 MA04 MA44
NA13 NA14 ZB26 ZC20 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 BA51 BA72 CA40 DA75 DA76 EA20
FA74