

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96104900

※申請日期：96.2.9

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗FGF19抗體及其使用方法

ANTI-FGF19 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商建南德克公司
GENENTECH, INC.

代表人：(中文/英文)

提摩西 R 史瓦茲
SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州舊金山市DNA路1號
1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 路斯 戴斯挪爾斯
DESNOYERS, LUC
2. 桃樂絲 法蘭琪
FRENCH, DOROTHY

國 籍：(中文/英文)

1. 加拿大 CANADA
2. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年02月10日；60/772,310

2. 美國；2006年03月09日；60/780,608

3. 美國；2007年01月19日；60/885,866

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體係關於分子生物學領域。更具體而言，本發明係關於抗-FGF19抗體、其使用方法、及FGF19及/或FGFR4之檢測。

【先前技術】

成纖維細胞生長因子(FGF)家族由22種在結構上相關的可與4種受體酪胺酸激酶(FGFR1-4)及一種激酶缺陷受體(FGFR5)結合的多肽構成(Eswarakumar 等人(2005) Cytokine Growth Factor Rev 16, 139-149；Ornitz 等人(2001) Genome Biol 2, REVIEWS3005；Sleeman 等人(2001) Gene 271, 171-182)。FGF與FGFR1-4之相互作用可導致受體同源二聚化作用及自磷酸化作用、胞漿連接器(例如FRS2)之募集反應及多重信號途徑之激活(Powers 等人(2000) Endocr Relat Cancer 7, 165-197；Schlessinger, J. (2004) Science 306, 1506-1507)。

FGF及FGFR藉由調節細胞增殖、遷移、趨化性、分化、形態形成及血管生成而在發育及組織修復中起重要作用，(Ornitz 等人(2001) Genome Biol 2, REVIEWS3005；Auguste 等人(2003) Cell Tissue Res 314, 157-166；Steiling 等人(2003) Curr Opin Biotechnol 14, 533-537)。若干FGF及FGFR與乳房、前列腺、子宮頸、胃及結腸癌之發病機理有關(Jeffers 等人(2002) Expert Opin Ther Targets 6, 469-482；Mattila 等人(2001) Oncogene 20, 2791-2804；

Ruohola等人(2001) *Cancer Res* 61, 4229-4237 ; Marsh等人(1999) *Oncogene* 18, 1053-1060 ; Shimokawa等人(2003) *Cancer Res* 63, 6116-6120 ; Jang (2001) *Cancer Res* 61, 3541-3543 ; Cappellen (1999) *Nat Genet* 23, 18-20 ; Gowardhan (2005) *Br J Cancer* 92, 320-327)。

FGF19係7個FGF亞類中最稀有的成員。FGF19係FGFR4之高親和性配體(Xie等人(1999) *Cytokine* 11:729-735)。FGF19通常由膽及腸上皮分泌。FGF19藉由抑制膽固醇-7- α -羥化酶1(Cyp7 α 1)(膽固醇及膽汁酸合成的限速酶)之肝臟表現而在膽固醇體內平衡中起重要作用(Gutierrez等人(2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 301-306 ; Yu等人(2000) *J Biol Chem* 275, 15482-15489 ; Holt, JA等人(2003) *Genes Dev* 17(130):158)。FGF19在一轉基因小鼠模型中之異位表現可增進肝細胞增殖、促進肝細胞發育異常並導致在10月齡時之腫瘤形成(Nicholes等人(2002). *Am J Pathol* 160, 2295-2307)。FGF19誘導肝細胞癌之機制據認為涉及FGFR4相互作用。用FGF-19進行處理可增大代謝速率並逆轉營養及瘦素缺陷型糖尿病。Fu等人(2004) 145:2594-2603。FGF-19亦闡述於(例如)Xie等人(1999) *Cytokine* 11:729-735 ; 及Harmer等人(2004) 43:629-640。

FGFR4表現分佈廣泛並發現於發育的骨骼肌、肝、肺、胰腺、腎上腺、腎及腦中(Kan等人(1999) *J Biol Chem* 274, 15947-15952 ; Nicholes等人(2002). *Am J Pathol* 160, 2295-2307 ; Ozawa等人(1996) *Brain Res Mol Brain Res* 41, 279-

288 ; Stark等人(1991) Development 113, 641-651)。FGFR4擴增發現於乳房及卵巢腺癌中(Jaakkola 等人(1993) Int J Cancer 54, 378-382)。FGFR4突變及平截與惡性腫瘤有關，且在一些情況下與前列腺及肺腺癌、頭與頸鱗狀上皮細胞癌、軟組織肉瘤、星形細胞瘤及垂體腺瘤有關(Jaakkola等人(1993) Int J Cancer 54, 378-382 ; Morimoto (2003) Cancer 98, 2245-2250 ; Qian (2004) J Clin Endocrinol Metab 89, 1904-1911 ; Spinola等人(2005) J Clin Oncol 23, 7307-7311 ; Streit等人(2004) Int J Cancer 111, 213-217 ; Wang (1994) Mol Cell Biol 14, 181-188 ; Yamada (2002) Neurol Res 24, 244-248)。

當前仍明顯需要具有對於開發成治療劑最理想之臨床屬性的藥劑。本文所述發明可滿足此需要並提供其他益處。

本文所引用的參考文獻(包括專利申請案及公開案)皆以引用的方式併入本文中。

【發明內容】

本發明係部分基於多種FGF19結合劑(例如抗體及其片段)之鑑別。FGF19呈現為一重要且有利的治療靶標，且本發明提供基於結合FGF19之組合物及方法。如本文所述，FGF19結合劑提供用於定標與FGF19-FGFR4途徑之表現及/或活性有關之病理學條件的重要的治療劑及診斷劑。因此，本發明提供與FGF19結合及FGF19及/或FGFR4結合之檢測有關的方法、組合物、套組及製造物件。

在一態樣中，本發明提供一經分離抗-FGF19抗體，其中

該抗體之一全長IgG形式以約20 pM或更佳之結合親和性特異性地與人類FGF19結合。如業內已確認，一配體與其受體之結合親和性可用多種測試法中之任一種進行測定，並以多種數量值表示。因此，在一實施例中，結合親和性係表示為K_d值並可反映內在的結合親和性(例如，具有最小親和性效應)。一般而言且較佳地，結合親和性係於活體外進行量測，無論在無細胞的或細胞關聯的環境中。許多業內已知測試法(包括本文所述彼等)中之任一種皆可用來獲得結合親和性測量值，包括(例如)生物傳感器(Biacore)、放射免疫分析(RIA)及ELISA。

在一態樣中，本發明提供一經分離的抗-FGF19抗體，其中一全長IgG形式之該抗體可以 6×10^5 (M⁻¹s⁻¹)或更佳之k_{on}及/或以 5×10^{-6} (s⁻¹)或更佳之K_{off}特異性地與人類FGF19結合。

在一態樣中，本發明提供可與FGF19之FGFR4結合區結合的經分離抗體。

在一態樣中，本發明提供一可與包含(基本上由其構成或由其構成)以下胺基酸序列之肽結合的經分離抗體：
GFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR (SEQ ID NO:9) 或
HLESDFMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR (SEQ ID NO:10)。

在某些實施例中，該經分離抗體可與包含(基本上由其構成或由其構成)胺基酸編號160-217、140-159、G133-R155、G156-R180及/或A183-G192之成熟人類FGF19胺基酸序列(即，缺少信號肽)之多肽結合。在某些實施例中，

該經分離抗體可與包含(基本上由其構成或由其構成)之胺基酸編號 P41-Y47、P41-F58、P51-F58、E81-R88、E124-N132及/或 H164-P171之成熟人類 FGF19 胺基酸序列(即，缺少信號肽)之多肽合成。

在一態樣中，本發明提供一種抗-FGF19抗體，其包含：至少 1、2、3、4、5 及/或 6 個選自由下列組成之群的超變區 (HVR) 序列：KASQDINSFLS (SEQ ID NO:1)、YRANRLVD (SEQ ID NO:2)、LQYDEFPLT (SEQ ID NO:3)、TYGVH (SEQ ID NO:5)、VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:6) 及 KEYANLYAMDY (SEQ ID NO:7)。

在一態樣中，本發明提供一種抗-FGF19抗體，其包含：至少 1、2、3、4、5 及/或 6 個選自由下列組成之群的超變區 (HVR) 序列：(a) 包含序列 KASQDINSFLS (SEQ ID NO:1) 之 HVR-L1；(b) 包含序列 YRANRLVD (SEQ ID NO:2) 之 HVR-L2；(c) 包含序列 LQYDEFPLT (SEQ ID NO:3) 之 HVR-L3；(d) 包含序列 TYGVH (SEQ ID NO:5) 之 HVR-H1；(e) 包含序列 VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:6) 之 HVR-H2；及 (f) 包含序列 KEYANLYAMDY (SEQ ID NO:7) 之 HVR-H3。

在一實施例中，本發明抗體包含具有下面序列之輕鏈可變結構域：DIKMTQSPSSMYASLGERTIPCKASQDINSFL)SWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTSSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)；且包含一具有下面序列之重鏈可變結構域：

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQS
PGKGLEWLGVWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSQVFF
KMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLTDSA
(SEQ ID NO:8)。

在一實施例中，本發明抗體包含一包含至少一個、至少兩個或全部三個選自由KASQDINSFLS (SEQ ID NO:1)；YRANRLVD (SEQ ID NO:2)；及LQYDEFPLT (SEQ ID NO:3)組成之群之HVR序列的輕鏈。

在一實施例中，該抗體包含具有胺基酸序列KASQDINSFLS (SEQ ID NO:1)之輕鏈HVR-L1。在一實施例中，該抗體包含具有胺基酸序列YRANRLVD (SEQ ID NO:2)之輕鏈HVR-L2。在一實施例中，該抗體包含具有胺基酸序列LQYDEFPLT (SEQ ID NO:3)之輕鏈HVR-L3。

在一實施例中，本發明抗體包含一包含至少一個、至少兩個或全部三個選自由TYGVH (SEQ ID NO:5)；(e)VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:6)；及KEYANLYAMDY (SEQ ID NO:7)組成之群之HVR序列的重鏈。

在一實施例中，該抗體包含具有胺基酸序列TYGVH (SEQ ID NO:5)之重鏈HVR-H1。在一實施例中，該抗體包含具有胺基酸序列VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:6)之重鏈HVR-H2。在一實施例中，該抗體包含具有胺基酸序列KEYANLYAMDY (SEQ ID NO:7)之重鏈HVR-H3。

在一實施例中，本發明抗體包含一含有至少一個、至少兩個或全部三個選自由TYGVH (SEQ ID NO:5)；(e)

VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:6)；及KEYANLYAMDY (SEQ ID NO:7)組成之群之HVR序列的重鏈，及一含有至少一個、至少兩個或全部三個選自由KASQDINSFLS (SEQ ID NO:1)；YRANRLVD (SEQ ID NO:2)；及LQYDEFPLT (SEQ ID NO:3)組成之群之HVR序列的輕鏈。

在一實施例中，本發明抗體包含具有下面序列之輕鏈可變結構域：DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFLWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)。

在一實施例中，本發明抗體包含一具有下面序列之重鏈可變結構域：QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTTGVHWVRQSPGKGLEWLGVWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:8)。

在另一態樣中，本發明提供可與一包含一具有序列：DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)之輕鏈可變結構域及一具有序列：QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:8)之重鏈可變結構域之抗體競爭結合至FGF19的抗-FGF19單株抗體。

在另一態樣中，本發明提供可結合與包含具有序列
 DIKMTQSPSSMYASLGERTIPCKASQDINSFLSWFQQKPG
 KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYED
 MGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)之
 輕鏈可變域及具有序列 QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCT
 SGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAF
 ISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLY
 AMDYWGQGTLTIVSA (SEQ ID NO:8)之重鏈可變域之抗
 體相同(或實質上相似)之FGF19抗原決定部位的抗-FGF19
 單株抗體。

如業內所瞭解，且如下文更詳細地加以闡述，端視背景
 及業內已知多種定義(如下文所闡述)，描繪一抗體之超變
 區的胺基酸位置/邊界可變化。處於可變結構域中的一些
 位置可視為雜超變位置，因為在一組標準下可認為該等位
 置處於一超變區中而在另一組標準下可認為其處於高可變
 區之外。該等位置之一或多個亦可出現於擴展的超變區
 (如下文所進一步定義)。

在某些實施例中，該抗體係單株抗體。在某些實施例
 中，該抗體係多株抗體。在某些實施例中，該抗體係選自
 由嵌合抗體、親和性成熟抗體、人類化抗體、及人類抗體
 組成之群。在某些實施例中，該抗體係抗體片段。在某些
 實施例中，該抗體係 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂ 或
 scFv。

在一實施例中，該抗體係嵌合抗體，例如一包含自非人

類供體移植給異源非人類、人類或人類化序列之抗原結合序列(例如框架及/或恆定結構域序列)之抗體。在一實施例中，該非人類供體係小鼠。在一實施例中，一抗原結合序列係合成的，例如藉由誘變作用(例如噬菌體呈現篩選等)而獲得。在一實施例中，一本發明嵌合抗體具有鼠V區及人類C區。在一實施例中，鼠輕鏈V區係與人類κ輕鏈融合。在一實施例中，鼠重鏈V區係與人類IgG1 C區融合。

本發明人類化抗體包括彼等在FR中具有胺基酸取代基之抗體及在接枝的CDR中具有變化的親和性成熟變體。CDR或FR中之經取代胺基酸並不限於存於供體或接受者抗體中之彼等。在其他實施例中，本發明抗體進一步包含Fc區中可導致包括經增強CDC及/或ADCC功能及B細胞殺傷力在內之經改良效應功能的胺基酸殘基變化。本發明其他抗體包括彼等具有可改良穩定性之具體變化的抗體。在其他實施例中，本發明抗體包含Fc區中可導致減小的效應功能(例如減小的CDC及/或ADCC功能及/或減小的B細胞殺傷力)之胺基酸殘基變化。在某些實施例中，本發明抗體之特徵在於與自然殺傷(NK)細胞上人類補體因子C1q及/或人類Fc受體之減小的結合(例如缺乏結合)。在某些實施例中，本發明抗體之特徵在於與人類FcγRI、FcγRIIA及/或FcγRIIIA之減小的結合(例如缺乏結合)。在某些實施例中，本發明抗體屬於IgG類(例如IgG1或IgG4)並包含至少一在E233、L234、L235、G236、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331及/或P329(根據

EU索引進行編號)中的突變。在某些實施例中，該等抗體包含突變L234A/L235A或D265A/N297A。

在一態樣中，本發明提供包含任一本文所提供抗原結合序列之抗-FGF19多肽，其中該抗-FGF19多肽特異性地與FGF19結合。

在一態樣中，本發明提供一包含與一藥劑(例如藥物)偶聯之任一本文所揭示抗-FGF19抗體的免疫偶聯物(可互換地稱為"抗體藥物偶聯物"或"ADC")。

● 本發明抗體可與FGF19結合，並在某些實施例中可調節一或多個FGF19-相關影響的方面，包括(但不限於)FGFR4激活、FGFR4下游分子信令、與FGF19結合的FGFR4之破壞、FGFR4多聚化、CYP7 α 1基因之表現、FGFR4、MAPK、FRS2及/或ERK2之磷酸化、 β -連環蛋白之激活、FGF19-促進的細胞遷移及/或任何生物學相關的FGF19及/或FGFR4生物學途徑之破壞，及/或對腫瘤、細胞增殖病症或癌症之治療及/或預防；及/或對與FGF19表現及/或活性(例如增強的FGF19表現及/或活性)有關之病症的治療或預防。在● 某些實施例中，本發明抗體特異性地與FGF19結合。在某些實施例中，該抗體特異性地與FGF19之FGFR4結合區結合。在某些實施例中，該抗體特異性地與具有一約20 pM或更強之Kd的FGF19結合。在某些實施例中，該抗體特異性地與具有一約40 nM或更強之Kd的FGF19結合。在某些實施例中，該本發明抗體可減小、抑制及/或阻斷活體內及/或活體外FGF19活性。在某些實施例中，該

抗體與FGFR4競爭結合(降低及/或阻斷FGFR4與FGF19之結合)。

在一態樣中，本發明提供一如下經分離抗-FGF19抗體：其可在與FGF19接觸的細胞中阻抑、降低及/或阻斷由FGF19誘導的對CYP7 α 1基因之表現的抑制。

在一態樣中，本發明提供一如下經分離抗-FGF19抗體：其可在與FGF19接觸的細胞中阻抑、降低及/或阻斷由FGF19-誘導的FGFR4、MAPK、FRS2及/或ERK2之磷酸化。

在一態樣中，本發明提供一可阻抑、降低及/或阻斷由FGF19促進的細胞遷移的經分離抗-FGF19抗體。在某些實施例中，該細胞係腫瘤細胞。在一些實施例中，該細胞係腫瘤細胞。在某些實施例中，該細胞係HCT116細胞。

在一態樣中，本發明提供一可於細胞中阻抑、降低及/或阻斷Wnt途徑激活的經分離抗-FGF19抗體。在某些實施例中，Wnt途徑激活包括 β -連環蛋白之酪胺酸磷酸化、Wnt靶基因之表現、 β -連環蛋白突變及E-鈣黏蛋白與 β -連環蛋白之結合。Wnt途徑激活之檢測為業內所瞭解，且本文對一些實例進行了闡述及例示。

在一態樣中，本發明提供一或多種本發明抗體及一載劑之組合物。在一實施例中，該載劑係醫藥上可接受之載劑。

在另一態樣中，本發明提供一包含一或多種本文所述抗-FGF19抗體及一載劑之組合物。此組合物可進一步包含

第二醫藥，其中該抗體係第一醫藥。此用於治療癌症之第二醫藥(例如)可係另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞因子、細胞因子拮抗劑、細胞毒性放射療法、腎上腺皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、鎮痛藥、抗血管劑或生長抑制劑。在另一實施例中，對受試者投與足量第二醫藥，其中該抗體為第一醫藥。此第二醫藥不只一種醫藥，且較佳係另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞因子、細胞因子拮抗劑、細胞毒性放射療法、腎上腺皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、鎮痛藥、抗血管劑或生長抑制劑。更具體的藥劑包括(例如)：伊立替康(irinotecan)(CAMPTOSAR®)；西土西單抗(cetuximab)ERBITUX®；氟維司群(fulvestrant)(FASLODEX®)；長春瑞濱(vinorelbine)(NAVELBINE®)；EFG受體拮抗劑，例如埃羅替尼(erlotinib)(TARCEVA®)；VEGF拮抗劑，例如貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN®)、長春新鹼(vincristine)ONCOVIN®)；mTor(一絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶)之抑制劑，例如雷帕黴素(rapamycin)及CCI-779；及抗-HER1、HER2、ErbB及/或EGFR拮抗劑，例如曲司佐單抗(trastuzumab)(HERCEPTIN®)、帕妥珠單抗(pertuzumab)OMNITARG™)或拉帕替尼(lapatinib)、及包括化學治療劑之其他細胞毒性劑。在某些實施例中，該第二醫藥為抗雌激素藥物(例如他莫昔芬(tamoxifen)、氟維司群(fulvestrant)或芳香化酶抑制劑)、針對血管內皮生長因子

(VEGF)或 ErbB 或 Efb 受體之拮抗劑、或 Her-1 或 Her-2。在某些實施例中，該第二醫藥係他莫昔芬、來曲唑 (letrozole)、依西美坦 (exemestane)、阿納托司唑 (anastrozole)、伊立替康、西土西單抗、氟維司群、長春瑞濱、埃羅替尼、貝伐單抗、長春新鹼、伊馬替尼 (imatinib)、索拉非尼 (sorafenib)、拉帕替尼或曲司佐單抗，且較佳該第二醫藥係埃羅替尼、貝伐單抗或曲司佐單抗。

● 在一態樣中，本發明提供一特異性地與本發明抗-FGF19 抗體結合的抗個體基因型抗體。

在一態樣中，本發明提供編碼本發明抗-FGF19 抗體之核酸。

在一態樣中，本發明提供包含本發明核酸之載體。

在一態樣中，本發明提供包含一或多種本發明核酸及載劑之組合物。在一實施例中，該載劑係醫藥上可接受之載劑。

● 在一態樣中，本發明提供包含本發明核酸及載體之宿主細胞。載體可屬於任何類型，例如重組體載體，如表現載體。可使用多種宿主細胞中之任何種類。在一實施例中，宿主細胞係原核細胞，例如大腸桿菌。在一實施例中，宿主細胞係真核細胞，例如哺乳動物細胞，如中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞。

在一態樣中，本發明提供製造本發明抗體之方法。舉例而言，本發明提供製造抗-FGF19 抗體 (如本文所定義，其

包括其全長及片段)之方法，該方法包括在適宜宿主細胞內表現編碼該抗體之本發明重組體載體，並回收該抗體。

在一態樣中，本發明提供一包括一容器及一包含於該容器內之組合物的製造物件，其中該組合物包含一或多種本發明抗-FGF19抗體。在一實施例中，該組合物包含一本發明核酸。在一實施例中，一包含抗體之組合物進一步包含載劑，其在一些實施例中係醫藥上可接受的。在一實施例中，本發明製造物件進一步包含對個體投與該組合物(例如該抗體)之說明書(例如用於本文所述任一方法之說明書)。

在一態樣中，本發明提供一種套組，其包含：一第一容器，其包含一含有一或多種本發明抗-FGF19抗體之組合物；及一第二容器，其包含一緩衝劑。在一實施例中，該緩衝劑係醫藥上可接受的。在一實施例中，一包含抗體之組合物進一步包含載劑，該載劑在一些實施例中係醫藥上可接受的。在一實施例中，一套組進一步包含用於對個體投與該組合物(例如抗體)之說明書。

在一態樣中，本發明提供一本發明抗-FGF19抗體在製備用於治療性地或預防性地治療病症(例如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)之醫藥中之用途。在某些實施例中，該癌症、腫瘤、及/或細胞增殖病症係結腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、乳腺癌、或胰腺癌。在某些實施例中，該病症係肝病，例如肝硬化。在某些實施例中，該病症係消耗性病症。

在一態樣中，本發明提供一本發明核酸在製備一用於治療性地及/或預防性地治療病症(例如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)之醫藥中之用途。在某些實施例中，該癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係結腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、乳腺癌或胰腺癌。在某些實施例中，該病症係肝病，例如肝硬化。在某些實施例中，該病症係消耗性病症。

在一態樣中，本發明提供一本發明表現載體在製備一用於治療性地及/或預防性地治療病症(例如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)之醫藥中之用途。在某些實施例中，該癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係結腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、乳腺癌或胰腺癌。在某些實施例中，該病症係肝病，例如肝硬化。在某些實施例中，該病症係消耗性病症。

在一態樣中，本發明提供一本發明宿主細胞在製備一用於治療性地或預防性地治療病症(例如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)之醫藥中之用途。在某些實施例中，該癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係結腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、乳腺癌或胰腺癌。在某些實施例中，該病症係肝病，例如肝硬化。在某些實施例中，該病症係消耗性病症。

在一態樣中，本發明提供一本發明製造物件在製備一用於治療性地及/或預防性地治療病症(例如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)之醫藥中之用途。在某些實施例中，該癌

症、腫瘤及/或細胞增殖病症係結腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、乳腺癌、或胰腺癌。在某些實施例中，該病症係肝病，例如肝硬化。在某些實施例中，該病症係消耗性病症。

在一態樣中，本發明提供一本發明套組在製備一用於治療性地或預防性地治療病症(例如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)之醫藥中之用途。在某些實施例中，該癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係結腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、乳腺癌或胰腺癌。在某些實施例中，該病症係肝病，例如肝硬化。在某些實施例中，該病症係消耗性病症。

本發明提供可用於調節與FGF19及/或FGFR4表現及/或活性有關之疾病狀態(例如增強的表現及/或活性或不期望的表現及/或活性)的方法及組合物，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。

在一態樣中，本發明提供用於殺滅細胞(例如癌症或腫瘤細胞)之方法，該方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。

在一態樣中，本發明提供用於減小、抑制、阻斷或預防腫瘤或癌症生長之方法，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。

本發明方法可用於影響任一適合的病理學狀態。本文對例示性病症進行闡述，其包括選自由下列組成之群之癌症：食管癌、膀胱癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺纖維

腺瘤、前列腺癌、頭頸鱗狀細胞癌、軟組織肉瘤、星形細胞瘤、垂體瘤、乳腺癌、成神經細胞瘤、黑素瘤、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)、上皮癌、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌及肝細胞癌。

在一實施例中，一靶向細胞在一本發明方法中係癌細胞。例如，一癌細胞可選自由下列癌細胞組成之群：乳腺癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、乳頭狀癌細胞、結腸癌細胞、胰腺癌細胞、卵巢癌細胞、子宮頸癌細胞、中樞神經系統癌細胞、食管癌細胞、骨源性肉瘤細胞、腎癌細胞、肝細胞癌細胞、膀胱癌細胞、胃癌細胞、頭頸鱗狀細胞癌細胞、黑色素瘤細胞、白血病細胞、腦癌細胞、子宮內膜癌細胞、睪丸癌細胞、膽管癌細胞、膽囊癌細胞、肺癌細胞及/或前列腺癌細胞。在一實施例中，一靶向細胞在一本發明方法中係高增殖性及/或增生性細胞。在一實施例中，一靶向細胞在一本發明方法中係發育異常細胞。在另一實施例中，一靶向細胞在一本發明方法中係遷移性細胞。

在一本發明實施例中，該靶向細胞係硬化肝細胞。

本發明方法可進一步包含另外的治療步驟。舉例而言，在一實施例中，一方法進一步包括一其中靶向細胞及/或組織(例如癌細胞)係經輻照處理或與化學治療劑接觸之步驟。

任一適合的抗-FGF19抗體皆可用於涉及治療及/或預防病症的方法，包括單株及/或多株抗體、人類抗體、嵌合

抗體、親和性成熟抗體、人類化抗體及/或抗體片段。在某些實施例中，該抗-FGF19抗體係任一本文所述抗-FGF19抗體。

在另一態樣中，本發明提供一任一本文所述抗-FGF19抗體與FGF19之複合物。在某些實施例中，該複合物係活體內的或活體外的。在某些實施例中，以可檢測方式對該抗-FGF19抗體進行標記。

在另一態樣中，本發明提供檢測FGF19之方法，該等方法包括在一生物試樣中檢測FGF19-抗-FGF19抗體複合物。本文所用術語"檢測"包括定性及/或定量檢測(量測水平)，參照或不參照對照物。

在另一態樣中，本發明提供用於檢測與FGF19表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自個體之生物試樣中檢測FGF19。在某些實施例中，該FGF19表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，該病症係腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。在某些實施例，該生物試樣係血清或腫瘤試樣。

在另一態樣中，本發明提供診斷與FGFR4表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自個體之生物試樣中檢測FGFR4。在某些實施例中，FGFR4表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，該病症係腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。在某些實施例，該生物試樣係

血清或腫瘤試樣。

在另一態樣中，本發明提供診斷與FGFR4及FGF19表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自個體之生物試樣中檢測FGFR4及FGF19。在某些實施例中，該FGF19表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，FGFR4表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，該病症係腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。在某些實施例，該生物試樣係血清或腫瘤試樣。在某些實施例中，FGFR4表現係在第一生物試樣中進行檢測，且FGF19表現係在第二生物試樣中進行檢測。

在另一態樣中，本發明提供為個體選擇治療之方法，該等方法包括：(a)對個體生物試樣中FGF19表現進行檢測，若存在；及(b)在步驟(a)完成後，為該個體選擇治療，其中治療選擇係基於在步驟(a)中檢測到的FGF19表現。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGF19表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGF19表現進行檢測。在某些實施例中，對FGF19表現進行檢測，並選擇利用抗-FGF19抗體之治療。在某些實施例中，該個體患有腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。

在另一態樣中，本發明提供為個體選擇治療之方法，該等方法包括：(a)對個體生物試樣中FGFR4表現進行檢測，

若存在；及(b) 在步驟(a)完成後，為該個體選擇治療，其中治療選擇係基於在步驟(a)中檢測到的FGFR4表現。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，對FGFR4表現進行檢測，並選擇利用抗-FGF19抗體之治療。在某些實施例中，該個體患有腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。

在另一態樣中，本發明提供為個體選擇治療之方法，該等方法包括：(a)對生物試樣中FGF19及FGFR4表現進行檢測，若存在；及(b)步驟(a)完成後，為該個體選擇治療，其中該治療選擇係基於步驟(a)中測得的FGF19及FGFR4表現。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGF19表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGF19表現進行檢測。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，對FGFR4及FGF19表現進行檢測，並選擇利用抗-FGF19抗體之治療。在某些實施例中，FGFR4表現係在第一生物試樣中進行檢測，且FGF19表現係在第二生物試樣中進行檢測。在某些實施例中，該個體患有腫

瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之抗-FGF19抗體(並且其中在投與抗-FGF19抗體之前、期間或之後在該個體生物試樣中對FGF19表現及/或FGFR4表現進行檢測)來治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症或肝病(例如肝硬化)之個體的方法。在某些實施例中，在投與抗-FGF19抗體之前、期間及/或之後對FGF19過表現進行檢測。在某些實施例中，在投與抗-FGF19抗體之前、期間及/或之後對FGFR4表現進行檢測。可在投與抗-FGF19抗體之前；期間；之後；在之後前及期間；之前及之後；期間及之後；或之前、期間及之後對表現進行檢測。

在涉及檢測之實施例中，除檢測FGFR4表現外或作為該檢測之替代方案，可對FGFR4下游分子信令之表現進行檢測。在某些實施例中，對FGFR4下游分子信令之檢測包括對MAPK、FRS2或ERK2磷酸化的一或多個檢測。

在某些涉及檢測之實施例中，FGFR4表現包括對FGFR4基因缺失、基因擴增及/或基因突變進行檢測。在某些涉及檢測之實施例中，FGF19表現包括對FGF19基因缺失、基因擴增及/或基因突變進行檢測。

某些涉及檢測之實施例進一步包括對Wnt途徑激活進行檢測。在某些實施例中，對Wnt途徑激活進行檢測包括 β -連環蛋白酪胺酸磷酸化、Wnt目標基因之表現、 β -連環蛋

白突變及E-鈣黏蛋白與 β -連環蛋白之結合之一或多種。Wnt途徑激活之檢測為業內所瞭解，且本文對一些實例進行了闡述及例示。

在某些實施例中，該治療係針對一選自由下列組成之群的癌症：結腸直腸癌、肺癌、卵巢癌、垂體癌、胰腺癌、乳腺纖維腺瘤、前列腺癌、頭頸鱗狀細胞癌、軟組織肉瘤、乳腺癌、成神經細胞瘤、黑素瘤、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)、上皮癌、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌及肝細胞癌。

本文(例如)於生物試樣之定義中對生物試樣進行闡述。在某些實施例，該生物試樣係血清或腫瘤試樣。

在涉及檢測FGF19及/或FGFR4表現之實施例中，可對FGF19及/或FGFR4多核苷酸表現及/或FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。在某些涉及檢測FGF19及/或FGFR4表現之實施例中，對FGF19及/或FGFR4 mRNA表現進行檢測。在其他實施例中，利用抗-FGF19藥劑及/或抗-FGFR4藥劑對FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。在某些實施例中，利用抗體對FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。任一適合的抗體皆可用於檢測及/或診斷，包括單株及/或多株抗體、人類抗體、嵌合抗體、親和性成熟抗體、人類化抗體及/或抗體片段。在某些實施例中，本文所述抗-FGF19抗體係用於檢測。在某些實施例中，利用免疫組織化學(IHC)對FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。在一些實施例中，使用IHC分析，FGF19表現得到2或更大之評

分。

在某些涉及檢測FGF19及/或FGFR4表現之實施例中，可對GF19及/或FGFR4表現之存在及/或缺失及/或水平進行檢測。FGF19及/或FGFR4表現可係增強的。應瞭解，FGF19及/或FGFR4表現之缺失包括不顯著的或微量的水平。在某些實施例中，測試生物試樣中FGF19表現較在對照生物試樣中觀察到的結果(或對照或參考之表現水平)更高。在某些實施例中，測試生物試樣中FGF19表現較對照生物試樣中高至少約2-倍、5-倍、10-倍、20-倍、30-倍、40-倍、50-倍、75-倍、100-倍、150-倍或更高。在一些實施例中，用免疫組織化學("IHC")分析法對FGF19多肽表現進行測定，對於染色密度得分至少為2或更大。在一些實施例中，用IHC分析法對FGF19多肽表現進行測定，對於染色密度得分至少為1或更大、或至少為3或更大。在某些實施例中，測試生物試樣中FGF19表現低於在對照生物試樣中所觀察到的結果(或對照表現水平)。

在一態樣中，本發明提供一經分離多核苷酸，其包含以下多核苷酸序列、由其構成或基本上由其構成：GAT CCC CCC TCG TGA GTC TAG ATC TAT TCA AGA GAT AGA TCT AGA CTC ACG AGG TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO:41)；AGC TTT TCC AAA AAA CCT CGT GAG TCT AGA TCT ATC TCT TGA ATA GAT CTA GAC TCA CGA GGG GG (SEQ ID NO:42)；GAT CCC CGA ACC GCA TTG GAG GCA TTA TCA AGA GAA ATG CCT CCA ATG CGG

TTC TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO:43); 或 AGC TTT
TCC AAA AAA GAA CCG CAT TGG AGG CAT TTC TCT
TGA TAA TGC CTC CAA TGC GGT TCG GG (SEQ ID
NO:44)。

【實施方式】

本發明提供抗-FGF19抗體，其係用於(例如)治療或預防與FGF19之表現及/或活性(例如增強的表現及/或活性或不期望的表現及/或活性)有關的疾病狀態。在某些實施例中，本發明抗體係用於治療腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症。

在另一態樣中，本發明抗-FGF19抗體可用作試劑來檢測及/或分離FGF19，例如檢測多種組織及細胞類型中之FGF19。

本發明進一步提供製備抗-FGF19抗體、編碼抗-FGF19抗體之多核苷酸、及包含編碼抗-FGF19抗體之多核苷酸的細胞的方法。

在另一態樣中，本發明提供包括檢測FGF19及/或FGFR4之方法。

一般技術

本文闡述或引用的技術及製程一般為彼等業內熟練的技術人員所熟知且其通常可使用常規操作法加以利用，例如，廣泛使用的闡述於下列文獻的操作法：Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel等人編輯, (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press公司): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames及G. R. Taylor編輯(1995)), Harlow及Lane編輯(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, 及 ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney編輯(1987))。

定義

"經分離"抗體係已經鑑定並自其天然環境組份中分離及/或回收之抗體。其天然環境之污染組份係會干擾抗體診斷或治療用途之物質, 且可能包括酵素、激素及其它蛋白質溶質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中, 需將抗體純化至(1)如由Lowry方法測定, 含有95重量%以上之抗體, 且最佳含有99重量%以上之抗體, (2)藉助旋壓杯測序分析儀測定達足以獲得至少15個N-末端或內部胺基酸序列殘基之程度, 或(3)藉由還原或非還原條件下以SDS-PAGE使用考馬斯藍或(較佳)銀染劑量測達均一性。既然不應存在任一種抗體天然環境組份, 故分離之抗體可包括重組細胞內之原位抗體。然而, 經分離的抗體通常應藉由至少一個純化步驟製備。

"經分離"核酸分子係如下核酸分子: 其係自至少一污染核酸分子中鑑別及分離出來, 其在該抗體核酸之天然來源中通常與該污染核酸分子結合。經分離核酸分子不同於其在自然界中所呈現的形式或構造。因此, 經分離核酸分子

與當其在天然細胞中存在時的核酸分子不同。然而，經分離核酸分子包括一包含於通常表現該抗體之細胞中的核酸分子，其中(例如)該核酸分子係處於與天然細胞不同的染色體位置。

術語"當在Kabat中時可變結構域編號"或"當在Kabat中時胺基酸位置編號"及其變化形式指在Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)中用於抗體編譯之重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域之編號系統。使用此編碼系統，該實際的直鏈胺基酸序列可包含與可變結構域之FR或CDR之縮短或向其中之插入相對應的較少的或額外的胺基酸。舉例而言，重鏈可變結構域可包括位於H2之殘基52後面之單個胺基酸插入(殘基52a，根據Kabat)及位於重鏈FR殘基82後面之多個經插入殘基(例如殘基82a、82b及82c等，根據Kabat)。對於一給定的抗體，藉由在該抗體序列之同源區域利用一"標準的"Kabat編號的序列進行對準可確定其殘基Kabat編號。

本文所用短語"實質上相似"或"實質上相同"表示一足夠高程度之介於兩數值(一般而言，一個與本發明抗體有關，另一個與參考/對比抗體有關)之間的相似性，以便業內熟練技術人員會考慮到在藉由該等值(例如Kd值)量測的生物學特徵之上下文中兩值之間的差異不重要或無生物學及/或統計學顯著性。介於該兩值之間的差異作為參照/對

比抗體之值的函數較佳小於約50%、較佳小於約40%、較佳小於約30%、較佳小於約20%、較佳小於約10%。

"結合親和性"一般而言指介於分子(例如抗體)之單結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間的合計非共價相互作用之強度。除非另外指明，本文所用"結合親和性"指介於結合對(例如抗體與抗原)成員間之可反應1:1相互作用的內在結合親和性。分子X對於其配偶體Y之親和性通常可藉由離解常數(Kd)表示。親和性可藉由業內已知常用方法進行量測，包括彼等本文所闡述之方法。低親和性抗體通常緩慢地與抗原結合並往往容易分離，然而高親和性抗體通常較快地與抗原結合並往往保持較長時間地結合。多種測定結合親和性之方法為業內人士所瞭解，其任一種皆可用於本發明之目的。具體說明性實施例於下文進行闡述。

在一實施例中，本發明該"Kd"或"Kd值"係藉由一放射標記的抗原結合分析法(RIA)進行量測，該抗原結合分析法係利用目標抗體之Fab變型及其抗原按以下分析法所述實施，該分析法藉由在一滴定系列的未經標記抗原之存在下用一最小濃度之(^{125}I)-標記的抗原使Fab平衡，然後用經抗-Fab抗體塗覆的板捕獲已結合的抗原來量測Fab對抗原之溶液結合親和性(Chen，等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881)。為建立該分析法之條件，用存於50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5微克/毫升的捕獲抗-Fab抗體(Cappel Labs)對微量滴定板(Dynex)實施塗覆過夜，並隨後在室溫下(約23°C)用存於PBS中之2% (w/v)的牛血清白蛋白實施2

至5小時阻斷。在一非吸附性板(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [125 I]-抗原與目標Fab之連續稀釋液混合(例如，根據抗-VEGF抗體Fab-12之評估，參見Presta等人，(1997) Cancer Res. 57:4593-4599)。然後對目標Fab實施培養過夜；然而，該孵化可持續更長時間段(例如65小時)以確保達成平衡。之後，將該混合物轉移至捕獲板在室溫下培養(例如1小時)。然後將溶液移除，用0.1%存於PBS中之Tween-20對該板實施8次洗滌。當板乾燥後，添加150微升/孔的閃爍液(MicroScint-20；Packard)，並在一Topcount gamma計數器(Packard)上對該等板實施10分鐘計數。選取可得到小於或等於20%最大結合之各Fab的濃度用於競爭性結合測試。根據另一實施例，Kd或Kd值係藉由利用表面電漿共振分析法進行量測，該分析法係在25℃下使用BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000(BIAcore 公司，Piscataway，NJ)用固定抗原CM5晶片以約10反應單位(RU)實施。簡言之，根據供應商技術說明書用N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀酰亞胺(NHS)對羧甲基化的葡聚糖生物感測器晶片(CM5，BIAcore公司)實施活化。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋為5微克/毫升(約0.2 uM)，然後以5微升/分鐘之流速注射，以達到約10反應單位(RU)之耦合的蛋白。抗原注射完成後，注入1 M乙醇胺以阻斷未反應基團。對於動力學量測，在25℃下以約25微升/分鐘之流速將Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)注入含有0.05% Tween 20(PBST)之

PBS 中。締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})係使用簡單的一對一 Langmuir 結合模型(BIAcore 評估軟體, 版本 3.2)藉由同時擬合締合及解離感應圖而計算。平衡離解常數(K_d)係按比率 k_{off}/k_{on} 進行計算。參見(例如)Chen, Y. 等人, (1999) J. Mol Biol 293:865-881。若藉由上述表面電漿共振分析法測得上速度超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 則上速率可藉由使用螢光消光技術進行量測, 該技術可量測螢光發射強度之增大或降低(激發(波長)=295 奈米; 發射(波長)=340 奈米, 16 奈米帶通)在 25°C , 一存於 PBS(pH 7.2)中之 20 nM 抗-抗原抗體(Fab 型), 在增大濃度之抗原(如於一光譜計中所量測)存在下, 例如一停流裝備的 spectrophometer(Aviv Instruments)或一 8000-系列 SLM-Aminco 光譜儀(ThermoSpectronic)帶有一攪拌紅色比色杯。

本發明"上速率"或"締合之速率"或"締合速率"或" k_{on} "亦可使用相同的上文所述表面電漿共振技術用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000(BIAcore 公司, Piscataway, NJ)在 25°C 下用經固定抗原 CM5 晶片以約 10 反應單位(RU)進行測定。簡言之, 根據供應商技術說明書用 N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及 N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)對羧甲基化的葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore 公司)實施活化。用 10 mM 乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋為 5 微克/毫升(約 0.2 μM), 然後以 5 微升/分鐘之流速注射, 以達到約 10 反應單位(RU)之耦合的蛋白。抗原注射完成後, 注入 1 M 乙醇胺以阻斷未反應基團。對於動力學量

測，在 25℃ 下以約 25 微升/分鐘之流速將 Fab 之兩倍連續稀釋液 (0.78 nM 至 500 nM) 注入含有 0.05% Tween 20 (PBST) 之 PBS 中。締合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off}) 係使用簡單的一對一 Langmuir 結合模型 (BIAcore 評估軟體，版本 3.2) 藉由同時擬合締合及解離感應圖而計算。平衡離解常數 (K_d) 係按比率 k_{off}/k_{on} 進行計算。參見 (例如) Chen, Y. 等人 (1999) J. Mol Biol 293:865-881。然而，若藉由上文表面電漿共振分析該締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則該締合速率較佳係藉由使用螢光猝滅技術進行測定，該螢光猝滅技術可在增大濃度之抗原存在下 (如在一諸如經止流裝備的分光光度計 (Aviv Instruments) 或帶有攪拌比色皿之 8000-系列 SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) 之分光光度計中測得)，量測一 20 nM 抗-抗原抗體存於 PBS (pH 7.2) 中之混合物在 25℃ 下之螢光發射強度 (激發=295 奈米；發射=340 奈米，16 奈米帶通) 增大或減小。

本文所用術語 "載體" 欲指能夠轉運其已連接的另一核酸的核酸分子。一類載體為 "質粒"，其指另外的 DNA 節段可連接至其中之環形雙鏈 DNA 環。另一類載體為噬菌體載體。另一類載體為病毒載體，其中另外的 DNA 節段可連接至病毒基因組中。某些載體能夠在已將他們引入其中之宿主細胞中進行自主複製 (例如具有細菌複製起始區之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體 (例如非游離型哺乳動物載體) 可藉由引入宿主細胞而整合至該宿主細胞之基因組中，並藉此隨宿主基因組一同複製。此外，某些載

體能夠引導其有效連接之基因的表現。該等載體本文稱為"重組表現載體"(或簡稱"重組載體")。一般而言，在重組DNA技術中可用表現載體通常呈質粒形式。在本說明書中，"質粒"及"載體"可互換使用，因為質粒係載體之最常用形式。

本文可互換使用之"多核苷酸"或"核酸"指任何長度之核苷酸聚合體，且包括DNA及RNA。該等核苷酸可係脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾的核苷酸或鹼基、及/或其類似物、或任何可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應併入聚合體之底物。多核苷酸可包含經修飾的核苷酸，例如甲基化的核苷酸及其類似物。若存在，對核苷酸結構之修飾可在該聚合體成形之前或之後實施。核苷酸序列可由非核苷酸組份打斷。多核苷酸合成後，可(例如)藉由與一標記物偶聯對其實施進一步修飾。其他類型修飾包括(例如)："戴帽"；用一類似物取代該等天然產生核苷酸之一或多個；核苷酸之間的修飾，例如彼等利用不帶電荷之鍵結(例如甲基膦酸酯類、磷酸三酯類、磷醯胺類、胺基甲酸酯類等)者及利用帶電荷鍵結(例如硫代磷酸酯類、二硫代磷酸酯類等)者、彼等包含側鏈部分(例如蛋白質，如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚-L-離胺酸等)者、彼等利用插入劑(例如吡啶、補骨脂素等)者、彼等包含螯合劑(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)者、彼等包含烷基化劑類、彼等利用經修飾鍵結(例如 α 端基異構核酸等)者，以及多核苷酸之未經修飾形式。此外，該等糖中

通常存在的任何羥基皆可經(例如)磷酸根基、磷酸根基替換，經標準保護基團保護、或經活化以準備形成與另外核苷酸之鍵結，或可與固體或半固體支持物偶聯。5'及3'末端OH可經經磷酸化或經胺基或含1至20個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可經衍生為標準保護基團。多核苷酸亦可包含業內通常已知之核糖或脫氧核糖之類似形式，包括(例如)2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟代-或2'-疊氮基-核糖，碳環形糖類似物， α -端基異構糖，差向異構糖(例如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚糖)，非環形類似物及鹼性核苷酸類似物(例如甲基核糖苷)。一或多個磷酸二酯鍵結可藉由替代鏈接基團替換。該等替代鏈接基團包括(但不限於)其中磷酸根係藉由P(O)S("硫代磷酸根")、P(S)S("二硫代磷酸根")、(O)NR₂("鹽胺")、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂("甲縮醛")替換之實施例，其中各R或R'獨立為H或係視情況包含一醚(-O-)鍵結之經取代或未經取代的烷基(1至20 C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基。一多核苷酸之全部鍵結不需要相同。前面闡述適用於本文引用之全部多核苷酸，包括RNA及DNA。

本文所用"寡核苷酸"通常指短的、單鏈的、合成的通常(但非必須)小於約200個核苷酸長的多核苷酸。術語"寡核苷酸"及"多核苷酸"並非相互排除。上文針對多核苷酸之闡述同樣並完全適用於寡核苷酸。

除非明確地或於上下文中另外指出，本文所用術語

"FGF19"(可互換地稱為"成纖維細胞生長因子19")指任何天然或變異的(無論天然的或合成的)FGF19多肽。術語"天然序列"尤其涵蓋天然產生之平截或分泌形式(例如一細胞外結構域序列)、天然產生之變異形式(例如替代地疊接形式)及天然產生之等位變體。術語"野生型FGF19"通常指包含天然產生之FGF19蛋白質之胺基酸序列的多肽。術語"野生型FGF19序列"通常指發現於天然產生之FGF19中的胺基酸序列。

除非明確地或於上下文中另外指出，本文所用術語"FGFR4"(可互換地稱為"成纖維細胞生長因子4")指任何天然或變異的(無論天然的或合成的)FGFR4多肽。術語"天然序列"尤其涵蓋天然產生之平截或分泌形式(例如一細胞外結構域序列)、天然產生之變異形式(例如替代地疊接形式)及天然產生之等位變體。術語"野生型FGFR4"通常指包含天然產生之FGFR4蛋白質之胺基酸序列的多肽。術語"野生型FGFR4序列"通常指發現於天然產生之FGFR4中的胺基酸序列。

術語"抗體"及"免疫球蛋白"係在最廣泛含義上可互換地使用並包括單株抗體(例如全長或完整的單株抗體)、多株抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體，只要其可顯示期望的生物活性)且亦可包括某些抗體片段(如本文更詳細地加以闡述)。抗體可係人類抗體、人類化抗體及/或親和性成熟抗體。

術語"可變"係指此情況：在抗體之間可變結構域的某些

部分於序列上存在廣泛差異且可用於實現每一特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，此可變性在整個抗體可變結構域中並非均勻分佈。其集中於三個於輕鏈及重鏈可變結構域中均存在的稱為互補決定區(CDR)或超變區的節段中。可變結構域中保守程度更高的部分稱為骨架(FR)。天然重鏈及輕鏈可變結構域各包括4個主要採用 β 折疊構造的由三個CDR連接的FR區，其形成連接且在某些情況下形成 β 折疊結構之部分的環。每一鏈中之CDR皆藉助FR區緊密地結合在一起並與另一鏈的CDR一起促成抗體之抗原結合位點形成(參見Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定結構域並不直接參與抗體與抗原之結合，但可展現多種效應子作用，例如抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

抗體經木瓜蛋白酶消化可產生兩個相同的稱作"Fab"片段之抗原結合片段，每一片段具有單個抗原結合位點；及一剩餘"Fc"片段，其名稱反映了其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理可產生 $F(ab')_2$ 片段，該片段具有兩個抗原結合位點且仍能夠交聯抗原。

"Fv"係含有完整的抗原識別及結合位點的最小抗體片段。在一雙鏈Fv種類中，此區域由一重鏈可變結構域與一輕鏈可變結構域呈緊密非共價聯合形式之二聚體構成。在一單鏈Fv種類中，一重鏈可變結構域及一輕鏈可變結構域可藉助一柔韌的肽連接子共價地連接以便該輕鏈及重鏈可

以一類似於雙鏈Fv種類中之"二聚體"結構相聯合。以此構造，每一可變結構域之三個CDR相互作用從而在該VH-VL二聚體的表面上界定一抗原結合位點。這六個CDR共同賦予了該抗體抗原結合特異性。然而，即使一單個可變結構域(或僅包含三個對一抗原具特異性的CDR的半個Fv)亦具有識別及與抗原結合的能力，但其親和性較整個結合位點低。

Fab片段亦包含輕鏈恆定結構域及重鏈第一恆定結構域(CH1)。Fab'片段因在重鏈CH1結構域之羧基端增加了若干殘基而與Fab片段有所不同，該等殘基包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。本文中Fab'-SH特指其中恆定結構域的一或多個半胱胺酸殘基具有一游離硫醇基之Fab'。F(ab')₂抗體片段起初形成時係二者之間具有鉸鏈半胱胺酸的Fab'片段對。亦已知抗體片段的其它化學偶合。

可根據其恆定結構域之胺基酸序列將來自任何脊椎動物種類之抗體(免疫球蛋白)"輕鏈"歸類為兩種完全不同類型(稱作 κ 及 λ)。

端視抗體"重鏈"恆定結構域之胺基酸序列，可將免疫球蛋白劃分成不同種類。存在五種主要類別的免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且可將該等中之多種進一步分成亞類(亞型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同免疫球蛋白種類之重鏈恆定結構域分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。人們熟知不同種類免疫球蛋白之亞單位結構及三維構型。

"抗體片段"包含完整抗體之一部分，其中該部分較佳可保留至少一種(較佳大多數)當存於完整抗體內時通常與該部分有關之功能。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙特異性抗體；直鏈抗體；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成的多特異性抗體。在一實施例中，抗體片段可包含該完整抗體之一抗原結合位點且因此而可保留與抗原結合之能力。在另一實施例中，一抗體片段(例如一包含Fc區之抗體片段)可保留至少一種當存於完整抗體中時通常與該Fc區有關之生物學功能，例如FcRn結合、抗體半衰期調節、ADCC功能及補體結合。在一實施例中，抗體片段為具有一實質上與完整抗體相似之活體內半衰期的單價抗體。舉例而言，此抗體片段可包含一連接至一能夠賦予該片段活體內穩定性之Fc序列的抗原結合臂。

術語"超變區"、"HVR"或"HV"當用於本文中時指抗體可變結構域中具有序列高可變性及/或可形成結構上經界定之環的區域。一般而言，抗體包含6個超變區；3個位於VH(H1、H2、H3)中，及3個位於VL(L1、L2、L3)中。本文使用並涵蓋許多超變區描述。Kabat互補性決定區(CDR)係基於序列可變性且係最常用描述(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia改為指結構性環之位置(Chothia及Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM超變區代表

介於Kabat CDR及Chothia結構性環之間的折衷形式，並為Oxford Molecular's AbM抗體建模軟體所採用。"接觸"超變區係基於對有效複合結晶結構之分析。

超變區可包含下面"擴展的超變區"：位於VL中之24-36 (L1)、46-56 (L2)及89-97 (L3)及位於VH中之26-35 (H1)、49-65或50至65 (H2)及93-102 (H3)。對於該等定義中的每一者，可變結構域殘基皆係根據Kabat等人(上文)所述進行編號。

"框架"或"FR"殘基係彼等除本文所定義之超變區殘基以外的可變結構域殘基。

非人類(例如鼠)抗體之"人類化"形式係包含源自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體係人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者超變區之殘基由來自非人類物種(例如小鼠、大鼠或非人類靈長類)超變區(供體抗體)之具有期望特異性、親和性及容量的殘基所取代。在一些情況中，人類免疫球蛋白框架區(FR)殘基由相應之非人類殘基所取代。此外，人類化抗體可包含未曾在接受者抗體或供體抗體中發現之殘基。實施此等修飾可進一步改良抗體特性。一般而言，人類化抗體包含實質上全部的至少一個、且通常兩個可變結構域，其中全部的或實質上全部的超變環對應於一非人類免疫球蛋白的CDR區，且全部的或實質上全部的FR為人類免疫球蛋白序列的FR區。人類化抗體視情況亦包含免疫球蛋白恆定區(通常為人類免疫球蛋白恆定區)的至少一部分。對於更

詳細闡述，參見 Jones 等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；
Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta,
Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。亦參見以下綜述
及其中所引用的參考文獻：Vaswani 及 Hamilton, *Ann.*
Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris,
Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle 及
Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

"嵌合"抗體(免疫球蛋白)具有一重鏈及/或輕鏈之部分，
其與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體的相
應序列相同或同源，而鏈之其餘部分與源自另一物種或屬
於另一抗體種類或亞類之抗體(以及此等抗體之片段)的相
應序列相同或同源，只要其展現期望生物活性即可(美國
專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人，*Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。如本文所用人類化抗體
係嵌合抗體之子集。

"單鏈 Fv"或"scFv"抗體片段包括抗體之 VH 及 VL 結構
域，其中此等結構域呈單多肽鏈形式。一般而言，scFv 多
肽進一步包括一位於 VH 與 VL 結構域之間的多肽連接子，
其能使 scFv 形成期望之抗原結合結構。對於 scFv 之綜述，
參見 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第 113
卷，Rosenburg 及 Moore 編輯，Springer-Verlag, New York,
第 269 至 315 頁 (1994)。

"抗原"抗體可選擇性地與之結合的預定抗原。靶抗原可
係多肽、醣類、核酸、脂質、半抗原或其他天然產生或合

成的化合物。較佳地，該靶抗原係多肽。

術語"雙特異性抗體"係指具有2個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段含有連接至同一多肽鏈(VH-VL)上輕鏈可變結構域(VL)之重鏈可變結構域(VH)。使用過短之連接子無法使同一鏈上的兩個結構域配對，故迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對並形成兩個抗原結合位點。雙特異性抗體更詳細地闡述於(例如)歐洲專利第EP 404,097號；WO 93/11161；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。

"人類抗體"係具有一與人類產生的或已使用任何如本文所揭示製造人類抗體之技術製得的抗體相一致之胺基酸序列者。此人類抗體定義具體而言可排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

"親和性成熟"抗體係在其一或多個CDR中存在一或多處改變之抗體，此等改變會使抗體對抗原之親和性與不具有該或該等改變之親本抗體相比有所改良。較佳親和性成熟抗體應對靶抗原具有奈莫耳或甚至為皮莫耳之親和性。親和性成熟抗體可藉由業內已知程序製備。Marks等人之Bio/Technology 10:779-783 (1992)闡述藉助VH及VL結構域重排之親和性成熟。CDR及/或框架殘基群之隨機誘變作用闡述於：Barbas等人之Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994)；Schier等人之Gene 169:147-155 (1995)；Yelton等人之J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人之J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)；及

Hawkins 等人之 *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

抗體"效應子作用"指彼等可歸因於抗體之Fc區(一天然序列Fc區或胺基酸序列變異Fc區)的生物學活性，且可隨抗體同型而變化。抗體效應子作用之實例包括：C1q結合及補體依賴細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導的細胞毒作用(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之減量調節；及B細胞激活。

"抗體依賴性細胞介導的細胞毒作用"或"ADCC"指一如下細胞毒性作用形式：其中分泌的Ig結合至位於某些細胞毒性細胞(例如自然殺傷(NK)細胞、嗜中性粒細胞、及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)上，從而使該等細胞毒效應細胞特異性地與帶有抗原之靶細胞結合，並隨後用細胞毒素殺死該靶細胞。該等抗體"武裝"細胞毒性細胞且為此殺滅所必需。介導ADCC之原代細胞(NK細胞)僅表現FcγRIII，然而單核細胞可表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。在 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁表3中對FcR於造血細胞上之表現進行了總結。為評估目標分子之ADCC活性，可實施一活體外ADCC分析，例如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或Presta美國專利第6,737,056號中所闡述之分析。用於此等分析之可用效應細胞包括末梢血單核細胞(PBMC)及天然殺傷(NK)細胞。或者或另外，可在活體內對目標分子之ADCC活性進行評估，例如在諸如 Clynes 等人之 *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型中進行評估。

"人類效應細胞"係表現一或多種FcR並發揮效應子作用之粒細胞。較佳地，該等細胞至少表現FcγRIII且可發揮ADCC效應子作用。可調介ADCC之人類粒細胞之實例包括外周血單核細胞(PBMC)、天然殺傷(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性粒細胞；其中PBMC及NK細胞較佳。效應子細胞可自天然來源(例如血液)分離得到。

術語"Fc受體"或"FcR"闡述可與抗體Fc區結合之受體。較佳FcR係天然序列人類FcR。此外，較佳FcR係可結合IgG抗體(一γ受體)之FcR並包括受體FcγRI、FcγRII及FcγRIII亞類，包括等位變體且可選擇地包括該等受體之經剪接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA("活化型受體")及FcγRIIB("抑制型受體")，二者具有類似胺基酸序列，主要在其胞質結構域上有所不同。活化型受體FcγRIIA在其胞質結構域中含有免疫受體酪胺酸激活基序(ITAM)。抑制型受體FcγRIIB在其胞質結構域中含有免疫受體酪胺酸抑制基序(ITIM)。(參見綜述：M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997))。Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)；Capel等人，Immunomethods 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)中對FcR進行綜述。本文術語"FcR"涵蓋其他FcRs，包括將來所鑑別出者。該術語亦包括新生兒受體(FcRn)，其負責將母體IgG傳遞至胎兒(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))及調節免疫球蛋白之體內穩態。

WO 00/42072 (Presta)闡述具有改良的及減小的與FcR之結合的抗體變體。該專利公開案之內容明確地以引用的方式併入本文中。亦參見Shields等人, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。

測定與FcRn之結合的方法已為人們所瞭解(參見(例如)Ghetie 1997, Hinton 2004)。在活體內與人類FcRn之結合及人類FcRn高親和性結合多肽之血清半衰期可在(例如)轉基因小鼠或可表現人類FcRn之經轉染人類細胞系中、或在經投與Fc變體多肽之靈長類動物中進行分析。

"補體依賴細胞毒作用"或"CDC"指在補體之存在下靶細胞之溶解。經典補體途徑之激活係藉由補體系統第一組份(C1q)與結合關聯抗原之抗體(屬於恰當亞類)的結合而起始。為評估補體激活,可實施CDC分析,例如 Gazzano-Santoro等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所闡述者。

具有改變的Fc區胺基酸序列及增大或減小的C1q結合能力之多肽變體闡述於美國專利第6,194,551B1號及WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容皆明確地以引用的方式併入本文中。亦參見Idusogie等人, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

"阻抑性"抗體或"拮抗劑"抗體係一可抑制或降低其所結合抗原之生物學活性的抗體。較佳阻抑性抗體或拮抗劑抗體可實質上或完全抑制該抗原之生物學活性。

"生物試樣"(可互換地稱為"試樣"或"組織或細胞試樣")

涵蓋自個體獲得的多種試樣類型且可在診斷或監測分析中使用。該定義涵蓋血液及生物學來源之其他液體試樣、固體組織試樣，例如活檢標本或組織培養物或自其中獲得的細胞、及其子代。該定義亦包括在獲取後以任一方式處理過的試樣，例如藉由用試劑處理、溶解或對某些組份(例如蛋白質或多核苷酸)進行濃縮、或包埋於半固體或固體基質中以便進行切割。術語"生物試樣"涵蓋臨床試樣，且亦包括培養基中的細胞、細胞上清液、細胞溶解產物、血清、血漿、生物體液及組織試樣。生物試樣來源可係取自一新鮮的、冰凍的及/或保存的器官或組織試樣或活體組織檢查或抽吸物之固體試樣；血液或任何血液組份；體液，例如腦脊髓液、羊水、腹水或間質液；取自受試者妊娠或發育中任一時間之細胞。在某些實施例中，該生物試樣係自原發性或轉移性腫瘤獲得。該生物試樣或包含與天然組織非天然混合的化合物，例如保存劑、抗凝劑、緩衝液、固定劑、營養素、抗生素或諸如此類。

就本發明而言，組織試樣之"切片"意指組織試樣之單份或塊，例如自組織試樣切下的組織薄片或細胞。應瞭解，根據本發明可獲取組織試樣之多個切片並對其實施分析。在一些實施例中，對相同切片實施形態學及分子水平兩方面的分析，或對其實質蛋白質及核酸兩種物質的分析。

詞語"標記物"當用於本文中時指直接或間接地偶聯或融合至一諸如核酸探針或抗體之試劑並有助於檢測其所偶聯或融合之試劑的化合物或組合物。該標記物自身可檢測到

(例如，放射性同位素標記或螢光標記)或當為酶標記物時可催化一可檢測的底物化合物或組合物的化學改變。

"醫藥"係用於治療所討論病症或其症狀或副作用之活性藥物。

"病症"或"疾病"係可得益於使用本發明物質/分子或方法之治療的任一病況。此包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物患上所討論疾病之彼等病理學條件。本文擬治療病症之非限制性實例包括惡性及良性腫瘤；癌瘤、胚細胞瘤及肉瘤。

術語"細胞增殖病症"及"增殖病症"指與某種程度之異常細胞增殖有關的病症。在一實施例中，該細胞增殖病症係癌症。

如本文所用"腫瘤"指所有贅瘤細胞生長及增殖(無論係惡性的或良性的)及所有癌前期的及癌性的細胞及組織。如本文所引用，術語"癌症"、"癌性的"、"細胞增殖病症"、"增殖病症"及"腫瘤"並不相互排斥。

術語"癌症"及"癌性的"指或描述哺乳動物中通常藉由脫調節細胞生長/增殖表徵的生理學病況。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。此等癌症之更具體實施包括鱗狀上皮細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食管癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺的腺癌、鱗癌、肺鱗狀細胞癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰腺癌、膠質細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、乳腺癌、結腸癌、結腸直腸癌、子

宮內膜或子宮癌瘤、唾液腺癌瘤、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌、胃癌、黑素瘤及多種類型的頭頸癌。血管生成失調可引起許多可藉由本發明化合物及方法治療的病症。該等病症包括非腫瘤性及腫瘤性疾病。腫瘤包括但不限於上文所闡述之彼等。非腫瘤病症包括但不限於：非期望的或異常的肥大、關節炎、類風濕性關節炎(RA)、乾癬、乾癬斑、類肉瘤病、動脈粥樣硬化、動脈粥樣硬化斑塊、糖尿病性及其他增殖性視網膜病，包括早產兒視網膜病、晶狀體後纖維組織增生症、新生血管性青光眼、年齡相關性黃斑變性、糖尿病性黃斑水腫、角膜新生血管形成、角膜移植片新生血管形成、角膜移植片排斥、視網膜/脈絡膜新生血管形成、眼角新生血管形成(發紅)、眼新生血管性疾病、血管狹窄、動靜脈畸形(AVM)、腦膜瘤、血管瘤、血管纖維瘤、甲狀腺超長增生(包括格拉夫病(Grave's disease))、角膜及其他組織移植、慢性炎症、肺炎、急性肺損傷/ARDS、膿毒症、原發性肺動脈高壓、惡性肺積水、腦水腫(例如伴隨急中風/閉合性頭部外傷/創傷者)、滑膜炎、RA中之血滑膜翳形成、骨化性肌炎、過度膨脹性骨形成、骨關節炎(OA)、頑固性腹水、多囊性卵巢病、子宮內膜異位症、第3液體間隙疾病(胰腺炎、間隔綜合徵、燒傷、腸疾病)、子宮平滑肌瘤、早產、慢性炎症(例如IBD(克隆氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎)、腎臟同種異體移植排斥、發炎性腸病、腎

病變綜合徵、不期望的或異常的組織積聚生長(非癌症)、血友病性關節、肥厚性瘢痕、毛髮生長抑制、奧斯勒-韋伯綜合徵(Osler-Weber syndrome)、膿性肉芽腫晶狀體後纖維組織增生、硬皮病、沙眼、血管黏連、滑膜炎、皮炎、先兆子癇、腹水、心包腔積液(例如伴隨心包炎者)及胸膜腔積液。

術語"消耗性"病症(例如衰竭綜合徵、惡病質、肌肉減少症)指一藉由不期望的及/或不健康的體重減小或體細胞質量減小引發的病症。在老年人中及在AIDS及癌症患者中，消耗性疾病可導致不期望的體重(包括脂肪及非脂肪成份)減小。消耗性疾病可能由與病症及/或衰老過程有關的攝食不足及/或代謝變化引起。癌症患者及AIDS患者，以及接受了大範圍手術或患有慢性感染、免疫性疾病、甲狀腺機能亢進、克隆氏病、心因性疾病、心臟衰竭或其他嚴重的創傷之患者會經常會患上消耗性疾病，其有時亦稱為惡病質，一代謝病症及(有時)一進食病症。惡病質另外可藉由代謝增進及分解代謝過度來表徵。儘管經常可互換地用惡病質及消耗性疾病指消耗性病況，至少有一個研究團體將惡病質作為一無脂肪體重及(尤其)體細胞質量之減小與消耗綜合徵中區別開(Mayer, 1999, J. Nutr. 129 (1S Suppl.):256S-259S)。肌肉減少症(另一可影響衰老個體之此類病症)可通常藉由肌肉質量減小來表徵。上文所述末期消耗性疾病可能發生於患有惡病質或肌肉減少症之個體中。

如本文所用，"治療"指欲改變受治療個體或細胞之自然過程的臨床干擾，且可為預防目的或在臨床病理學過程期間執行。治療之期望影響包括：干擾疾病的發生或復發、症狀之減輕、疾病之任何直接或間接病理學結果之減小、疾病增進速率之降低、疾病狀態之轉佳或緩和、及緩解或改良的預後。在一些實施例中，本發明抗體係用於延遲一疾病或病症之發展。

一"抗血管生成劑"或"血管生成抑制劑"指一可直接地或間接地抑制血管生成、血管發生、或不期望的血管滲透性的小分子量物質(多核苷酸、多肽、經分離蛋白質、重組蛋白質、抗體、或其偶聯物或融合蛋白)。例如，一抗血管生成劑係上文所定義的血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如 VEGF 之抗體、VEGF 受體之抗體、可阻斷 VEGF 受體信令的小分子(例如 PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248 (sunitinib malate)、AMG706)。抗血管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑，例如血管抑素、血管內皮抑素等。參見(例如)：Klagsbrun 及 D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991)；Streit 及 Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)(例如，表3列示惡性黑色素瘤的抗血管生成療法)；Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)；Tonini 等人, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)(例如，表2列示抗血管生成因子)；及，Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (例如，表1列示在臨床試驗中使用的抗血管生成劑)。

"個體"係一脊椎動物，較佳係一哺乳動物，更佳係一人。哺乳動物包括(但不限於)：農業動物(例如奶牛)、運動動物、寵物(例如貓、狗及馬)、靈長類、小鼠及大鼠。

用於治療目的之"哺乳動物"指任何歸為哺乳動物之動物，包括人類、家畜及飼養動物，以及動物園、運動場的動物或寵物，例如狗、馬、貓、奶牛等。該哺乳動物較佳係人。

"有效量"係指在所需時期內以所需劑量有效達成期望治療或預防效果之量。

本發明物質/分子(激動劑或拮抗劑)之"治療有效量"可根據諸如疾病狀態、年齡、性別及個體體重以及該物質/分子(激動劑或拮抗劑)之能力而有所不同以便在該個體內引發一期望反應。治療有效量亦為其中該物質/分子(激動劑或拮抗劑)之治療有益作用大於其任何毒性或有害作用之量。"預防有效量"係指在所需時期內以所需劑量有效達成期望預防效果之量。通常但非必須地，由於預防劑量係在患病之前或患病早期用於個體中，所以預防有效量將少於治療有效量。

本文所用術語"細胞毒性劑"係指可抑制或妨礙細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語欲包括：放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及Lu的放射性同位素)；化學治療劑，例如胺甲蝶呤(methotrexate)、阿黴素(adriamycin)、長春花生物鹼類(vinca alkaloids)(長春新鹼(vincristine)、長春花鹼

(vinblastine)、依託泊苷(etoposide)、多柔比星(doxorubicin)、美法倫(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔紅黴素(daunorubicin)或其他插入試劑；酵素及其片段，例如溶核酵素；抗生素；及毒素，例如細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶促活性毒素，包括其片段及/或變體；及下文所揭示多種抗腫瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒性劑於下文進行闡述。殺腫瘤細胞劑可消滅引起腫瘤細胞。

"化學治療劑"係用於治療癌症之化學化合物。化學治療劑之實例包括烷基化作用劑，例如噻替哌(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸酯，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶類，例如benzodopa、卡波醌(carboquone)、米得哌(meturedopa)及uredopa；伸乙基亞胺類及甲基嘧胺類，包括六甲嘧胺、三伸乙基嘧胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫化磷醯胺及三羥甲基嘧胺；番荔枝內酯類(尤其係布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； Δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)； β -拉帕醌(β -lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物托泊替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(依立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼、東莨菪內酯(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑素(bryostatin)；

callystatin ; CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼白毒素(podophyllotoxin)；鬼白酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；克利特非辛(cryptophycin)(特別係克利特非辛1及克利特非辛8)；多拉司他汀(dolastatin)；多卡米星(duocarmycin)(包括合成類似物：KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；pancratistatin；sarcodictyin；海綿素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、荼氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、氮氯酸氧氮芥、美法倉(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥膽甾醇酯(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、羅氮芥(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及ranimustine；抗生素，例如烯二炔抗生素(例如，卡奇黴素(calicheamicin)，尤其係卡奇黴素 γ 1I及卡奇黴素 ω 1I(參見例如，Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33 : 183-186 (1994))；dynemicin，包括dynemicin A；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新製癌菌素發色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、

authramycin、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、chromomycinis、放線菌素 D(dactinomycin)、柔紅黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮胺酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin)(包括嗎啉基-多柔比星、氟嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及脫氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(例如絲裂黴素 C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗-代謝物，例如胺甲喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，例如二甲葉酸(denopterin)、胺甲喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，例如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、

二脫氧尿苷(dideoxyuridine)、脫氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，例如卡魯甾酮(calusterone)、丙酸甲雄烷酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、環戊縮環硫雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺素，例如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，例如甲醯四氫葉酸(frolinic acid)；乙醯葡醛酸內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；bestrabucil；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；elfornithine；依利乙銨(elliptinium acetate)；an epothilone；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；蘑菇多糖；氣尼達明(lonidainine)；類美登素類(maytansinoids)，例如美登素(maytansine)及柄型菌素(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；mopidanmol；尼群克林(nitraerine)；噴托他丁(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多糖複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根微素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；螺旋鍺(spirogermanium)；細格孢氮雜酸(tenuazonic

acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢徽烯族毒素類(trichothecenes)(尤其係T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素(roridin A)及蛇形菌素(anguidin))；烏拉坦(urethane)；長春地辛(vindesine)(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；gacytosine；阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C")；噻替哌(thiotepa)；紫杉烷類(taxoids)，例如TAXOL®紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANETM Cremophor-free、白蛋白-調控的紫杉醇奈米顆粒調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；chloranbucil；2,2-二氟脫氧胞嘧啶核苷(gemcitabine)(GEMZAR®)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；胺甲喋呤；鉑類似物，例如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine)(VELBAN®)；鉑；表鬼柏毒素(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼(ONCOVIN®)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；甲醯四氫葉酸(leucovorin)；長春瑞濱(vinorelbine)(NAVELBINE®)；諾安托(novantrone)；道諾黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine)

(DMFO)；類視色素，例如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)(XELODA®)；上述各物之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物；以及兩或多個上述各物之組合，例如CHOP、環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及強的松組合療法之縮寫；及FOLFOX、奧沙利鉑(ELOXATINTM)聯合5-FU及甲醯四氫葉酸之治療方案的縮寫。

此定義亦涵蓋對能促進癌生長之激素影響具有調節、降低、阻斷、或抑制作用且通常呈系統性或全身性治療形式的抗激素劑。其可係激素自身。實例包括抗-雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括(例如)它莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®它莫昔芬)、EVISTA®雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基泰米芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗黃體激素(anti-progesterones)；雌激素受體下調劑(ERD)；可用於抑制或關閉卵巢之作用劑，例如，促黃體激素-釋放激素(LHRH)激動劑，例如LUPRON®及ELIGARD®乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acetate)及雷公藤精(tripterelin)；其他抗-雄激素，例如氟利坦(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及可抑制酵素芳香化酶之芳香化酶抑制劑，其可調節腎上腺中雌激素之產生，例如，4(5)-咪唑類、胺魯米特、MEGASE®乙酸甲地

孕酮 (megestrol acetate)、AROMASIN® 依西美坦 (exemestane)、福美司坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、RIVISOR® 伏氣唑 (vorozole)、FEMARA® 來曲唑 (letrozole) 及 ARIMIDEX® 阿納曲唑 (anastrozole)。此外，此化學治療劑之定義包括雙膦酸鹽類，例如氯膦酸鹽 (clodronate)(例如，BONEFOS® 或 OSTAC®)，DIDROCAL® 依替膦酸鹽 (etidronate)、NE-58095、ZOMETA® 唑來膦酸 (zoledronic acid)/ 唑來膦酸鹽、FOSAMAX® 阿倫膦酸鹽 (alendronate)、AREDIA® 帕米膦酸鹽 (pamidronate)、SKELID® 替魯膦酸鹽 (tiludronate) 或 ACTONEL® 利塞膦酸鹽 (risedronate)；以及曲沙他濱 (troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其係彼等可抑制涉及黏附細胞增殖之信號轉導途徑中基因表現者，例如，PKC- α 、Raf、H-Ras、及表皮生長因子受體 (EGF-R)；疫苗，例如 THERATOPE® 疫苗及基因治療疫苗，例如，ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN® 疫苗及 VAXID® 疫苗；LURTOTECAN® 拓撲異構酶 1 抑制劑；ABARELIX® rmRH；二甲苯磺酸拉帕替尼 (lapatinib ditosylate)(ErbB-2 及 EGFR 雙重酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱作 GW572016)；及任一上述各物之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物。

"生長抑制劑"在本文中指可抑制活體外或活體內細胞(例如表現 FGF19 之細胞)生長的化合物或組合物。因此，該生長抑制劑可係一顯著降低 S 期細胞(例如表現 FGF19 之細胞)

百分比之藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進行(在除S期之外的地方)之藥劑，例如可誘導G1阻滯及M期阻滯的藥劑。傳統M期阻滯劑包括長春花製取物(長春新鹼及長春花鹼)、紫杉烷類、及拓撲異構酶II抑制劑，例如多柔比星、表柔比星、柔紅黴素、依託泊苷及博萊黴素。彼等阻滯G1之藥劑亦溢出進入S期阻滯，舉例而言，DNA烷化劑，例如他莫昔芬、強的松、達卡巴嗪、氮芥、順鉑、胺甲蝶呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他信息參見 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel，編輯，第1章，標題為 "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"，Murakami等人著，(WB Saunders: Philadelphia, 1995)，尤其第13頁。紫杉烷類(紫杉醇及多西他賽)兩者皆係自紫杉得到的抗癌藥。紫杉醇及多西他賽可促進微管自微管蛋白二聚體之裝配並藉由防止解聚而使微管穩定，其可導致細胞中有絲分裂之抑制。

"多柔比星"係蒽環類抗生素。多柔比星之全化學名為(8S-順)-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧- α -L-來蘇基-吡喃己糖基)氧]-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-8-(羥基乙醯基)-1-甲氧基-5,12-並四苯二酮。

術語"包含Fc區之多肽"指一諸如抗體或免疫黏合素(參見下文定義)之多肽，其包含一Fc區。Fc區之C-末端離胺酸(根據EU編碼系統之殘基447)可(例如)在該多肽提純期間或藉由重組設計編碼該多肽之核酸而去除。因此，本發明一包含具有Fc區之多肽的組合物可包含具有K447之多肽、去

除全部 K447 之多肽或一具有 K447 殘基之多肽及不具有 K447 殘基之多肽的混合物。

本發明組合物及製備其之方法

本發明涵蓋組合物，包括醫藥組合物，包含一抗-FGF19 抗體；及包含編碼一抗-FGF19 抗體之序列的多核苷酸。如本文所用，組合物包含一或多種可與 FGF19 結合的抗體、及/或一或多種包含編碼一或多種可與 FGF19 結合之抗體之序列的多核苷酸。該等組合物可進一步包含適合的載劑，例如醫藥上可接受之賦形劑(包括緩衝劑)，該等載劑為業內人士所熟知。

本發明亦涵蓋經分離抗體及多核苷酸實施例。本發明亦涵蓋實質上純淨的抗體及多核苷酸實施例。

本發明抗-FGF19 抗體較佳係單株的。本發明範圍亦涵蓋本文所提供抗-FGF19 抗體之 Fab、Fab'、Fab'-SH 及 F(ab')₂ 片段。該等抗體片段可藉由傳統方法(例如酶消化法)製造或可藉由重組技術產生。該等抗體片段可係嵌合抗體或人類化抗體。該等片段可用於下文提出的診斷及治療目的。

單株抗體可由一群實質同源抗體(即，除可能存在極少量天然存在之突變體外，構成該群體之各個抗體均相同)獲得。故修飾語"單株"表示該抗體之特徵在於不是分立抗體之混合物。

本發明抗-FGF19 單株抗體可藉由用 Kohler 等人首先於 Nature, 256:495 (1975) 中闡述的雜交瘤方法製得，或可藉由重組 DNA 法(美國專利第 4,816,567 號)製得。

在雜交瘤方法中，對小鼠或其他適宜宿主動物(例如倉鼠)進行免疫以誘發可產生或能夠產生與免疫所用蛋白質特異性結合之抗體的淋巴細胞。FGF19之抗體通常係在動物中藉由多重皮下(sc)或腹膜腔內(ip)注射FGF19及一佐劑而產生。FGF19可使用業內已知方法製備，其中某些方法在本文中進一步加以闡述。舉例而言，下文對FGF19之重組產生進行闡述。在一實施例中，用一包含與免疫球蛋白重鏈Fc部分融合之FGF19細胞外結構域(ECD)的FGF19衍生物對動物進行免疫。在一實施例中，用FGF19-IgG1融合蛋白對動物進行免疫。通常用單磷醯脂A(MPL)/海藻糖二黴菌酸酯(TDM)(Ribi Immunochem. Research 公司，Hamilton，MT)對動物進行免疫以抑制免疫原性偶聯物或FGF19衍生物，且該溶液係在多個位點經皮內注射。兩周後對該動物實施追加注射。7至14天後，取動物血樣並對血清實施抗-FGF19滴度分析。對動物實施加強，直至滴度上升至穩定水平。

或者，可在活體外對淋巴細胞進行免疫。然後利用一適合的融合劑(例如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合，以形成雜交瘤細胞(Goding，*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*，第59至103頁(Academic Press，1986))。

將如此製備的雜交瘤細胞接種於適合的培養基中並使其生長，其中該培養基較佳包含一或多種可抑制未融合之親代骨髓瘤細胞之生長或存活的物質。舉例而言，若該親代

骨髓瘤細胞缺乏酵素次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則雜交瘤培養基通常應包含次黃嘌呤、胺基蝶呤、及胸苷(HAT培養液)，此等物質可防止HGPRT缺陷細胞之生長。

較佳骨髓瘤細胞係彼等高效融合、支持藉助所選擇抗體生成細胞之穩定的高水平抗體生產及對於培養基(例如HAT培養基)具有敏感性的骨髓瘤細胞。該等中，較佳骨髓瘤細胞系為小鼠骨髓瘤系，例如源自MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤(可自沙克研究院細胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center得到)，San Diego, California USA得到)及SP-2或X63-Ag8-653細胞(可自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection)，Rockville, Maryland USA得到)之彼等。亦有人闡述將人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞系用於生產人類單株抗體(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51至63頁(Marcel Dekker公司, New York, 1987))。

對培養雜交瘤細胞的培養基實施定向抑制FGF19之單株抗體之產量的分析。較佳地，藉由雜交瘤細胞生產的單株抗體之結合特異性係藉由免疫沉澱作用或藉由活體外結合分析(例如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附劑分析(ELISA))進行測定。

單株抗體之結合親和性可(例如)藉由Munson等人(Anal. Biochem., 107:220 (1980))之Scatchard分析法進行測定。

當雜交瘤細胞經鑒定可產生具有期望特異性、親和性及/或活性之抗體後，可藉由有限稀釋程序對該等純係實施亞選殖並藉助標準方法使其生長(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59 至 103 頁 (Academic Press, 1986))。用於此目的之適合的培養基包括(例如)：D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，可使該等雜交瘤細胞作為動物體內之腹水腫瘤於活體內生長。

由亞係分泌的單株抗體係藉由習用免疫球蛋白提純過程(蛋白A-瓊脂糖凝膠、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳、透析、或親和層析法)以適當方式自培養基、腹水液體或血清中分離出來。

本發明抗-FGF19抗體可藉由利用組合庫製造以篩選具有期望活性之合成抗體純系。原則上，合成抗體純係藉由包含可展示多種與噬菌體外殼蛋白融合之抗體可變區(Fv)片段之噬菌體的篩選噬菌體文庫進行選定。藉由針對期望抗原的親和層析法對此等噬菌體進行淘選。表現能與期望抗原結合之Fv片段的純系被吸附至該抗原上並因此而與該文庫中未結合純系分離。然後將結合純系自抗原上洗脫下來，並可藉由另外的抗原吸附/洗脫循環使其進一步富集。本發明任何抗-FGF19抗體皆可藉由設計一適合的抗原篩選程序對目標噬菌體純系進行選擇、然後利用取自目標噬菌體純系之Fv序列及適合的恆定區(Fc)序列(闡述於Kabat等人之 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD

(1991), 第1至3卷中)構建一全長抗-FGF19抗體純系而獲得。

一抗體之抗原結合結構域係由兩個約110個胺基酸之可變(V)區形成，任一個皆來自輕(VL)鏈及重(VH)鏈，皆存在三個超變環或互補決定區(CDR)。可變結構域可在噬菌體上功能性地展示為單鏈Fv(scFv)片段，其中VH及VL係經由一短撓性肽共價地連接，或功能性地展示為Fab片段，其中其各融合於一恆定結構域中並且非共價地相互作用，如 Winter 等人 (Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994))所闡述。如本文所用，編碼噬菌體純系之 scFv 及編碼噬菌體純系之 Fab 共同稱為 "Fv噬菌體純系" 或 "Fv純系"。

VH及VL基因之集合可分別藉由聚合酶鏈反應(PCR)進行選殖，且可在噬菌體文庫中隨機重組，隨後可對其進行檢索用於抗原結合純系中，如 Winter 等人 (Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994))所闡述。來自經免疫源之文庫可提供針對抗原之高親和性抗體且無需構建雜交瘤。或者，可對初級集合進行選殖以提供一針對廣範圍非自身抗原及亦自身抗原之人類抗體的單來源且無需任何免疫過程，如 Griffiths 等人 (EMBO J, 12: 725-734 (1993))所闡述。最終，亦可藉由自幹細胞選殖未經重排的V基因節段並使用包含隨機序列之PCR引物來編碼高可變CDR3區域及完成活體外重排而以合成方式製得初級文庫，如 Hoogenboom及 Winter(J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992))

所闡述。

藉由與小外殼蛋白pIII融合，可用絲狀噬菌體來顯示抗體片段。該等抗體片段可展示為單鏈Fv片段，其中VH及VL結構域係藉助一撓性間隔結構連接於相同多肽鏈上，如Marks等人(J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991))所闡述；或展示為Fab片段，其中一鏈與pIII融合，而另一鏈分泌至細菌宿主細胞周質中，於此處形成Fab-外殼蛋白結構之裝配物，其可藉由替代某些野生型外殼蛋白而在噬菌體表面上展示，如Hoogenboom等人(Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991))所闡述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸係自採集於人類或動物之免疫細胞獲得。若期望一有利於抗-FGF19純系之偏移的文庫，則用FGF19對受試者進行免疫以產生抗體應答，並回收脾細胞及/或循環B細胞其他外周血淋巴細胞(PBL)用於文庫構建。在一較佳實施例中，一有利於抗-人FGF19純系之偏移的人類抗體基因片段文庫係藉由在載有功能性人類免疫球蛋白基因陳列(並缺乏功能性內源抗體產生系統)之轉基因小鼠中產生一抗-人FGF19抗體應答以便FGF19免疫作用可引起B細胞產生抑制FGF19的人類抗體而獲得。生成人類抗體之轉基因小鼠的產生在下文中進行闡述。

抗-FGF19反應性細胞群體之其他富集物可藉由使用適宜篩選程序來分離表現FGF19-特異性膜結合抗體之B細胞而獲得，例如藉由用FGF19親和層析法或先將細胞吸附至經

螢光色素標記的FGF19上再進行流式活化細胞分選(FACS)而進行之細胞分離。

或者，脾細胞及/或B細胞或取自一未經免疫供體之其他PBL之使用可提供可能抗體集合之一較佳表現，且亦容許使用其中FGF19不具有抗原性之任何動物(人類或非人類)種類來構建抗體文庫。對於包括活體外抗體基因構建之文庫，自受試者採集幹細胞以提供編碼未經重排抗體基因節段的核酸。目標免疫細胞可自多種動物種類獲得，例如人類、小鼠、大鼠、兔形目、狼、犬、貓、豬、牛、馬及鳥類等等。

自目標細胞回收編碼抗體可變基因節段(包括VH及VL節段)的核酸並實施擴增。當為重排的VH及VL基因文庫時，所欲之DNA可藉由自淋巴細胞中分離基因組DNA或mRNA，再藉由使用匹配經重排VH及VL基因5'及3'端之引物的聚合酶鏈反應(PCR)而獲得，如Orlandi等人(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989))所闡述，藉此而製得用於表現之多樣V基因集合。V基因可自cDNA及基因組DNA進行擴增，其中反向引物位於編碼成熟V-結構域之外顯子的5'端且正向引物位於J-區段內，如Orlandi等人(1989)及Ward等人(Nature, 341: 544-546 (1989))所闡述。然而，對於自cDNA之擴增，反向引物亦可基於先導外顯子內，如Jones等人(Biotechnol., 9: 88-89 (1991))所闡述，且正向引物處於恆定區內，如Sastry等人(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989))所闡述。為使互補

性最大化，可將簡併性納入該等引物中，如 Orlandi 等人 (1989) 或 Sastry 等人 (1989) 所闡述。較佳地，其藉由使用靶向各 V 基因家族之 PCR 引物以擴增該免疫細胞核酸樣品中所存在的所有可用 VH 及 VL 排列而使庫多樣性達最大程度，例如，如 Marks 等人 (J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)) 之方法中所闡述及 Orum 等人 (Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)) 之方法中所闡述。為將經擴增 DNA 選殖至表現載體中，可將少量限制位點作為位於一端的標籤引入 PCR 引物中，如 Orlandi 等人 (1989) 所闡述；或藉著以經標記引物進行進一步之 PCR 擴增，如 Clackson 等人 (Nature, 352: 624-628 (1991)) 所闡述。

以合成方式重排的 V 基因之集合可於活體外自 V 基因節段衍生。人們已對大多數人類 VH-基因節段進行了選殖及測序 (由 Tomlinson 等人於 J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992) 中報告)，並繪圖 (由 Matsuda 等人於 Nature Genet., 3: 88-94 (1993) 中報告)；該等經選殖節段 (包括 H1 及 H2 環狀結構之所有主要構形) 可用於以編碼不同序列及長度之 H3 環狀結構之 PCR 引物而產生不同之 VH 基因集合，如 Hoogenboom 及 Winter (J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)) 所闡述。亦可使 VH 集合之全部序列多樣性集中於單一長度的長 H3 環狀結構中，如 Barbas 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)) 所闡述。人們已對人類 V κ 及 V λ 節段進行選殖並測序 (由 Williams 及 Winter 於 Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993) 中報告) 且其可用於獲得合成的輕鏈集

合。基於一系列 VH 及 VL 折疊及 L3 和 H3 長度的合成 V 基因集合將編碼具有相當大之結構多樣性的抗體。進行 V 基因編碼性 DNA 之擴增後，可根據 Hoogenboom 及 Winter 之方法 (J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)) 對胚系 V 基因節段實施活體外重排。

藉由以若干方法將 VH 及 VL 基因集合合併在一起可構建抗體片段集合。將各集合構建於不同載體中，並於活體外 (如 Hogrefe 等人於 Gene, 128: 119-126 (1993) 中所闡述) 或於活體內藉由組合感染 (例如 Waterhouse 等人於 Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993) 中所闡述的 loxP 系統) 重組該等載體。活體內重組方法利用 Fab 片段之雙鏈性質來克服大腸桿菌轉化率造成的對文庫大小的限制。分別對初級 VH 及 VL 集合進行選殖，一種選殖至噬菌粒中而另一種選殖至噬菌體載體中。然後藉由包含噬菌粒之細菌的噬菌體感染將該兩文庫合併，以使各細胞包含一不同的組合，且該文庫大小僅受細胞存在的數目 (約 10^{12} 純系) 的影響。兩載體皆包含活體內重組信號，以使 VH 及 VL 基因重組到一單複製子上並共封裝至噬菌體病毒粒子中。該等大文庫可提供數量巨大的具有良好親和性 (約 10^{-8} M 之 K_d^{-1}) 之多樣化抗體。

或者，可依序將該等集合選殖至相同載體中，如 Barbas 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)) 所闡述，或藉由 PCR 組裝在一起並隨後進行選殖，如 Clackson 等人 (Nature, 352: 624-628 (1991)) 所闡述。亦可

用 PCR 裝配將 VH 及 VL DNA 與一編碼撓性肽間隔結構之 DNA 連接起來以形成單鏈 Fv(scFv) 集合。在另一技術中，在淋巴細胞中用 "細胞內裝配" 組合 VH 及 VL 基因並隨後對所連接基因之集合進行選殖，如 Embleton 等人 (Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)) 所闡述。

藉由初級文庫 (天然的或合成的) 產生的抗體可具有中等親和性 (約 10^6 至 10^7 M^{-1} 之 K_d^{-1})，但亦可藉由構建第二文庫並自其中重新選擇而在活體外模擬親和性成熟，如 Winter 等人 ((1994)，上文) 所闡述。舉例而言，可在活體外用 Hawkins 等人 (J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)) 之方法或用 Gram 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)) 之方法藉由使用易錯聚合酶 (如 Leung 等人於 Technique, 1: 11-15 (1989) 中所報告) 隨機引入突變。另外，親和性成熟可藉由在所選個體 Fv 純系中 (例如使用具有載有跨越目標 CDR 之隨機序列之引物的 PCR) 使一或多個 CDR 隨機地發生變異及篩選較高親和性純系而實施。WO 9607754 (1996 年 3 月 14 日公佈) 闡述一種將誘變作用引入一免疫球蛋白輕鏈之互補決定區中以構建一輕鏈基因文庫。另一有效方法係用自未經免疫供體獲得的天然產生之 V 結構域變體之集合藉由噬菌體展示來重組所選 VH 或 VL 結構域並在鏈重配置的多個循環中篩選高親和性者，如 Marks 等人 (Biotechnol., 10: 779-783 (1992)) 所闡述。此技術可產生具有 10^{-9} M 範圍之親和性的抗體及抗體片段。

編碼 FGF19 之核酸序列可使用所期望的 FGF19 區域之胺

基酸序列進行設計。或者，可使用cDNA序列(或其片段)。其他FGF19序列進一步揭示於(例如)NM_022963，及Xie等人(1999) Cytokine 11:729-735中。編碼FGF19之DNA可藉由業內已知多種方法製備。該等方法包括(但不限於)藉由Engels等人(Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989))所闡述方法之任一種進行化學合成，例如三酯、亞磷酸酯、亞磷醯胺及H-磷酯法。在一實施例中，在FGF19-編碼DNA之設計中使用藉由表現宿主細胞優選的密碼子。或者，編碼FGF19之DNA可自一基因組或cDNA文庫中分離出來。

當構建編碼FGF19之DNA分子後，使該DNA分子以可操作方式連結至一表現載體(例如質粒)中之表現控制序列上，其中該控制序列係藉由用該載體轉化的宿主細胞進行識別。一般而言，質粒載體包含自可與宿主細胞相容之種類獲得的複製及控制序列。該載體通常載有一複製位點、以及可編碼在經轉化細胞中能夠提供表型選擇之蛋白質的序列。在原核及真核宿主細胞中適宜表現載體係業內所熟知者且本文對某些載體進一步加以闡述。可使用真核生物(例如酵母)或源自多細胞生物(例如哺乳動物)之細胞。

視情況，編碼FGF19之DNA係以可操作方式連結至可導致宿主細胞向培養基中分泌表現產物之分泌型前導序列上。分泌型前導序列之實例包括stII、ecotin、lamB、皰疹GD、lpp、鹼性磷酸酶、轉化酶及 α 因子。亦適合在本文中使用者係蛋白A之36個胺基酸的前導序列(Abrahmsen等

人，EMBO J., 4: 3901 (1985))。

用上文所述本發明表現或選殖載體對宿主細胞實施轉染且較佳對其實施轉化，並在經調節而適於誘導啟動子、選擇轉化株或擴增編碼期望序列之基因的習用營養培養基中進行培養。

轉染指宿主細胞對一表現載體之吸收，不論實際上是否進行表現。很多轉染方法為普通熟練技術者所瞭解，例如， CaPO_4 沉澱法及電穿孔法。一般而言，當此載體在該宿主細胞中出現起作用之跡象時，認為轉染成功。轉染方法為業內人士所熟知，且本文對某些方法進一步加以闡述。

轉化指將DNA引入一有機體中以便可作為一染色體外成份或藉助染色體整合體來對該DNA進行複製。端視所用宿主細胞，轉化係使用使用對此等細胞適宜的標準技術完成。用於轉化之方法為業內人士所熟知，且本文對某些方法進一步加以闡述。

用於產生FGF19之原核宿主細胞可通常如Sambrook等人(上文)所述進行培養。

用於產生FGF19的哺乳動物宿主細胞可在多種培養基中進行培養，此為業內所熟知且本文對某些培養基進行闡述。

本揭示內容中所引用宿主細胞涵蓋活體外培養細胞以及處於宿主動物體內的細胞。

FGF19之純化可使用業內認可的方法完成。

可使純化的FGF19結合至一適合的基質(例如瓊脂糖小球、玻璃小球、纖維素、多種丙烯酸共聚物、羥基異丁烯酸酯凝膠、聚丙烯酸與聚甲基丙烯酸共聚物、奈龍、中性及離子載劑及諸如此類)上用於噬菌體展示純系之親和層析分離。FGF19蛋白質與該基質之結合可藉由Methods in Enzymology, 第44卷(1976)中所闡述方法實施。一使蛋白質配體與基質(例如瓊脂糖、葡聚糖或纖維素)結合之通常所採用技術包括：用鹵化氫激活載體，並隨後將該肽配體之一級脂肪族或芳香族胺與該經活化的基質偶合。

或者，可用FGF19塗覆吸附板各孔，在附著至吸附板的宿主細胞上表現或用於細胞分選中，或偶聯至生物素以供用經抗生蛋白鏈菌素塗覆的珠子捕獲，或用於任何其他業內已知淘選噬菌體展示文庫之方法中。

在適合至少一部分噬菌體顆粒與該吸附物結合的條件下使噬菌體文庫樣品與經固定的FGF19結合。通常，對該等條件(包括pH、離子強度、溫度及諸如此類)進行選擇以模擬生理條件。對結合至該固體相之噬菌體實施洗滌並隨後藉由酸(如Barbas等人於Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)中所闡述)，或藉由鹼(如Marks等人於J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)中所闡述)，或藉由FGF19抗原競爭實施洗脫，此係(例如)以一類似於Clackson等人(Nature, 352: 624-628 (1991))之抗原競爭方法的程序實施。在一單選擇循環中，可將噬菌體富集至20-1,000-倍。此外，在細菌培養物中對該等經富集的噬菌體進行培養，

並對其實施另外的選擇循環。

選擇效率取決於諸多因素，包括洗滌期間的解離動力學、及單個噬菌體上的多種抗體片段是否可同時與抗原結合。具有快速解離動力學(及弱結合親和性)之抗體可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體展示及固相中抗原之高塗覆密度而保留。高密度不僅可經由多價相互作用來穩定噬菌體，而且有利於使已解離的噬菌體重新結合。具有慢解離動力學(及良好的結合親和性)之抗體的選擇可藉由使用長洗滌時間及單價噬菌體展示(如 Bass 等人之 *Proteins*, 8: 309-314 (1990) 中及 WO 92/09690 中所闡述)及低抗原塗覆密度(如 Marks 等人於 *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992) 中所闡述)而保留。

有可能在對 FGF19 具有不同親和性(甚至輕微不同的親和性)之噬菌體抗體之間進行選擇。然而，選定抗體之隨機突變(例如在上述某些親和性成熟技術中實施的)很可能會引發許多突變，大部分可與抗原結合，且少量具有較高親和性。對於限制 FGF19，可競爭出少數高親和性噬菌體。為保持所有較高親和性突變體，可用過量的生物素化 FGF19 對噬菌體實施培養，但經生物素化的 FGF19 之莫耳濃度較 FGF19 之目標莫耳親和常數為低。隨後可用經抗生蛋白鏈菌素塗覆的順磁珠對該等高親和性結合噬菌體實施捕獲。此"平衡捕獲"容許根據結合親和性對抗體進行選擇，其靈敏度容許對僅具有兩倍高親和性的突變純與具有低親和性的大為過量的噬菌體分離。亦可對用於洗滌與固

相結合的噬菌體之條件進行操控以在解離動力學的基礎上進行區分。亦可對抗-FGF19純系實施活性選擇。

使用習用程序(例如藉由使用經設計以特異性地自雜交瘤或噬菌體DNA模板擴增目標重鏈及輕鏈編碼區域的寡核苷酸引物)可容易地對編碼本發明噬菌體展示Fv純系或源自雜交瘤之單株抗體之DNA進行分離及測序。一經分離後，可將該DNA置於表現載體中，隨後將其轉染至宿主細胞(例如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或不會另外產生免疫球蛋白蛋白之骨髓瘤細胞)中，以在重組體宿主細胞中實現所期望單株抗體之合成。關於重組體在抗體編碼DNA之細菌中表現的綜述論文包括 Skerra等人，Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)及 Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992)。

可將編碼本發明Fv純系之DNA與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知DNA序列(例如可用Kabat等人於上文所述方法獲得的適宜的DNA序列)合併以形成編碼全長或部分長度的重鏈及/或輕鏈的純系。應瞭解，任何同種型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)皆可用於此目的，且此等恆定區可自任何人或動物種類獲得。如本文所用定義"嵌合"及"雜種"抗體涵蓋一源自一動物(例如人類)種類之可變結構域DNA並隨後融合至另一動物種類之恆定區DNA以形成"雜交"全長重鏈及/或輕鏈之編碼序列之Fv純系。在一較佳實施例中，一源自人類可變DNA之Fv純系融合至人類恆定區DNA以形成所有人類全長或部分長度重

鏈及/或輕鏈之編碼序列。

亦可對編碼本發明源自雜交瘤之抗-FGF19抗體之DNA進行修飾，例如，藉由用人類重鏈及輕鏈恆定結構域之編碼序列替代源自雜交瘤純系之同源鼠序列(如Morrison等人的方法：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984))。編碼源自雜交瘤或Fv純系之抗體或片段的DNA可進一步藉由以共價方式將全部或部分一非免疫球蛋白多肽之編碼序列加入該免疫球蛋白編碼序列而進行修飾。以此方式製備的"嵌合"或"雜種"抗體具有源自Fv純系或雜交瘤純系之本發明抗體的結合特異性。

抗體片段

本發明涵蓋抗體片段。在某些情況下，使用抗體片段(而不是完整抗體)係有益的。該等片段較小從而可以快速清除，且有利於到達實體瘤。

對於抗體片段之生產，人們已經開發了多種技術。傳統上，該等片段係經由對完整抗體實施蛋白水解消化而獲得(參見(例如)Morimoto等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，Science, 229:81 (1985))。然而，現在藉由重組宿主細胞可直接生產該等片段。大腸桿菌可表現及分泌出全部的Fab、Fv及scFv抗體片段，因此可容易地生產大量該等片段。可自上文討論的噬菌體文庫中分離出抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段，並以化學方式偶合以形成F(ab')₂ 片段(Carter等人，Bio/Technology

10:163-167 (1992))。根據另一途徑，可直接自重組宿主細胞培養基中分離出F(ab')₂片段。包含補救受體結合抗原決定部位殘基且具有增強的活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段闡述於美國專利第5,869,046號。熟練從業者應清楚地瞭解生產抗體片段之其他技術。在其他實施例中，選定抗體係單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185；美國專利第5,571,894號；及第5,587,458號。Fv及sFv係僅有的缺乏恆定區之完整結合位點；因此，其在活體內使用期間適合於減小的非特異性結合。sFv融合蛋白可經構建而在sFv之胺基或羧基末端產生效應子蛋白之融合。參見Antibody Engineering, ed. Borrebaeck，上文。該抗體片段亦可為"直鏈抗體"，舉例而言，如美國專利第5,641,870號所闡述。此等直鏈抗體片段可係單特異性抗體或雙特異性抗體。

人類化抗體

本發明涵蓋人類化抗體。業內已知多種用於對非人類抗體實施人類化之方法。例如，一人類化抗體可具有一個或多個自一非人類來源引入其中的胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基經常稱為"引入"殘基，其通常取自一"引入"可變結構域。人類化基本上可遵循Winter及同事之方法(Jones等人，(1986) Nature 321:522-525；Riechmann等人，(1988) Nature 332:323-327；Verhoeyen等人，(1988) Science 239:1534-1536)藉由用超變區序列取代人類抗體之相應序列而實施。因此，此"人類化"抗體係嵌合抗體(美國

專利第4,816,567號)，其中實質上小於一完整人類可變結構域之部分已由來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為其中某些超變區殘基及可能某些FR殘基係藉由齧齒類動物抗體中類似位點之殘基取代的人類抗體。

欲用於製備人類化抗體之人類可變結構域的選擇(包括輕鏈及重鏈二者)對於降低抗原性非常重要。根據所謂"最佳擬合"方法，針對習知人類可變結構域序列之完整文庫篩選齧齒類動物抗體可變結構域之序列。然後將最接近於該齧齒類動物的人類序列作為人類化抗體之框架(Sims等人 (1993) J. Immunol. 151:2296；Chothia等人 (1987) J. Mol. Biol. 196:901)。另一方法使用一源自一特定輕鏈或重鏈亞群之所有人類抗體一致序列的特定框架。對於不同的人類化抗體可使用相同的框架(Carter等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285；Presta等人(1993) J. Immunol., 151:2623)。

更為重要的是，經人類化之抗體需保留對抗原之高親和性及其他有利的生物學性質。為達成此目標，根據一種方法，人類化抗體可藉由使用親代與人類化序列之三維模型來分析親代序列及各種概念性人類化產物之方法製備。三維免疫球蛋白模型通常可購得且為彼等熟習此項技術者所熟知。可使用電腦程式，該等電腦程式可闡明並展示精選候選免疫球蛋白序列之可能的三維構象結構。通過觀察此等展示內容可分析此等殘基在候選免疫球蛋白序列功能行

使中之可能作用，即分析可影響候選免疫球蛋白與其抗原相結合之能力的殘基。以此方式，可從接受者及引入序列中選擇FR殘基併合並以達成期望抗體特徵，例如對靶抗原之親和性的增加。一般而言，超變區殘基直接且最為實質性地與影響抗原結合有關。

人類抗體

本發明人類抗-FGF19抗體可藉由將選自源自人類之噬菌體展示文庫之Fv純系可變結構域序列與上文所述已知人類恆定結構域序列結合而構建。或者，本發明人類單株抗-FGF19抗體可藉由雜交瘤方法製得。用於生產人類單板單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠人類雜骨髓瘤細胞系已揭示於Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)；Brodeur等人，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51至63頁 (Marcel Dekker公司，New York, 1987)；及Boerner等人，J. Immunol., 147: 86 (1991)。

目前能夠產生轉基因動物(例如小鼠)，該等轉基因動物經免疫後能夠在不產生內源免疫球蛋白之情況下產生人類抗體之完整集合。舉例而言，有人曾闡述了嵌合及種系突變小鼠中抗體重鏈接合區(JH)基因之純合缺失會導致內源抗體產生之完全抑制。將人類種系免疫球蛋白基因排列轉入此等種系突變小鼠中可在受到抗原攻擊後引起人類抗體之產生。參見(例如)Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362: 255

(1993) ; Bruggermann 等人 , Year in Immunol., 7: 33 (1993)。

基因重排亦可用於自非人類(例如齧齒類動物)抗體得出人類抗體，其中該人類抗體具有與起始非人類抗體相似的親和性及特異性。根據此方法(亦稱為"抗原決定部位印刻作用")，如上文所述藉由噬菌體展示技術獲得的非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區由人類V結構域基因之集合替換，產生一群非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體。利用基因之選擇可導致一非人類鏈/人類鏈嵌合scFv或Fab之分離，其中該人類鏈可恢復在初級噬菌體展示選殖中當移除對應的非人類鏈時被破壞的抗原結合位點，即，抗原決定部位可控制(印刻)人類鏈配偶體之選擇。當重複該過程以便替換剩餘非人類鏈時，獲得一人類抗體(參見PCT WO 93/06213，1993年4月1日公開)。不像藉助CDR移植的非人類抗體之傳統人類化，此技術可完全提供人類抗體，其不具有非人類起源的FR或CDR殘基。

雙特異性抗體

雙特異性抗體係對至少兩種不同抗原具有結合特異性之單株的、較佳係人類的或人類化的抗體。在本案例中，結合特異性之一係針對FGF19而另一結合特異性係針對任何其他抗原。例示性雙特異性抗體可與FGF19蛋白質之兩不同的抗原決定部位結合。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑局部化至可表現FGF19的細胞。該等抗體具有一FGF19結合臂及一可與細胞毒性劑(例如皂草素、抗干擾

素- α 、長春花生物鹼、蓖麻毒A鏈、胺甲蝶呤或放射性同位素半抗原)結合的臂。雙特異性抗體可製備成全長抗體或抗體片段(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。

製備雙特異性抗體之方法係業內已知方法。傳統上，雙特異性抗體之重組產生係基於其中兩重鏈具有不同特異性之兩免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現(Milstein及Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈係隨機組合，該等雜交瘤(四源雜交瘤(quadromas))可產生一10種不同抗體分子之可能混合物，其中僅一種具有正確的雙特異性結構。該正確分子之提純(其通常藉由親和層析步驟完成)相當麻煩，且產品產率不高。相似製程揭示於1993年5月13日公開的WO 93/08829及Traunecker等人之EMBO J., 10: 3655 (1991)中。

根據一不同且更佳的方法，使具有期望結合特異性之抗體可變結構域(抗體-抗原結合性部位)與免疫球蛋白恆定結構域序列融合。該融合體較佳具有免疫球蛋白重鏈恆定結構域，該結構域包含鉸鏈區、CH2區及CH3區中的至少一部分。較佳地，至少所述融合體之一中具有包含輕鏈結合所需位點之第一重鏈恆定區(CH1)。將編碼免疫球蛋白重鏈及(若需要)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入分開的表現載體中，並將其共轉染至適宜宿主有機體中。當構造中所用比例不等的三個多肽鏈可提供最優產率時，此為調整實施例中三個多肽片段間的相互比例提供了很大的靈活性。然而，當至少兩個等比例多肽鏈之表現產生高產率或當該等

比例無特別顯著性時，有可能將兩個或所有三個多肽鏈之編碼序列插入一個表現載體中。

在本方法一較佳實施例中，雙特異性抗體由一個臂上之具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈與另一臂上之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)構成。人們發現此種不對稱結構可促進期望雙特異性化合物與不期望之免疫球蛋白鏈組合的分離，乃因僅在一半雙特異性分子中存在免疫球蛋白輕鏈可提供一種易操作之分離方法。此方法揭示於WO 94/04690中。對於生成雙特異性抗體之進一步詳述，參見(例如)Suresh等人，Enzymology, 121:210 (1986)。

根據另一方法，可對介於一對抗體分子之間的連接區加以構建以使可自重組細胞培養物回收之異源二聚體的百分比最大化。較佳連接區至少包含抗體恆定結構域之CH3結構域的一部分。在該方法中，用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替代來自第一抗體分子連接區之一或多個小胺基酸側鏈。用較小側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)替代較大胺基酸側鏈藉此在第二抗體分子連接區上形成與大側鏈具有相同或類似大小之補償"腔"。此提供了將異源二聚體產率提高至高於其他不期望之終產物(例如同源二聚體)的途徑。

雙特異性抗體包括交聯或"雜偶聯"抗體。例如，呈雜偶聯形式之抗體之一可結合至抗生物素蛋白，而另一個可結合至生物素上。例如，曾有人提出用此等抗體來使免疫系統細胞靶向有害細胞(美國專利第4,676,980號)及用其治療

HIV 感染 (WO 91/00360、WO 92/00373 及 歐洲 專利 第 EP 03089 號)。雜偶聯抗體可使用任何簡便的交聯方法製備。適合的交聯劑為業內所熟知，且與許多交聯技術一道揭示於美國專利第 4,676,980 號中。

自抗體片段生成雙特異性抗體之技術在該文獻中亦進行了闡述。例如，可使用化學鍵結來製備雙特異性抗體。Brennan 等人 (Science, 229: 81 (1985)) 闡述一種其中以蛋白質水解方式來解離完整抗體以產生 $F(ab')_2$ 片段的製程。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉之存在下，對該等片段實施還原以穩定鄰近的二硫醇類及防止分子間二硫鍵結形成。然後將所形成之 Fab' 片段轉化成硫代硝基苯甲酸鹽 (TNB) 衍生物。然後經巯乙胺還原而將 Fab' -TNB 衍生物之一重新轉化成 Fab' -硫醇並使之與等莫耳量的其他 Fab' -TNB 衍生物混合以形成雙特異性抗體。可使用所產生之雙特異性抗體作為選擇性固定酵素之作用劑。

最新進展已使直接自大腸桿菌中回收 Fab' -SH 片段變得容易進行，該等片段可以化學方式偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby 等人，J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) 闡述了完整人類化雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子之產生。每一 Fab' 片段可分別由大腸桿菌分泌並使之在活體外接受定向化學結合以形成雙特異性抗體。如此形成之雙特異性抗體能夠結合過表現 HER2 受體之細胞及正常人類 T 細胞，而且能夠觸發人類細胞毒性淋巴細胞針對人類乳房腫瘤靶標之細胞溶解活性。

亦曾有人闡述了用於直接自重組細胞培養物中製備及分離雙特異性抗體片段的各種技術。例如，曾使用白胺酸拉鏈生成了雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白質之白胺酸拉鏈胜肽連接至兩個不同抗體之Fab'部分上。使抗體同源二聚體在鉸鏈區受到還原以形成單體且隨後重新氧化以形成抗體異源二聚體。此方法亦可用於產生抗體同源二聚體。Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)闡述之"雙功能抗體"技術為製備雙特異性抗體片段提供了一種替代途徑。該等片段含有經連接子與輕鏈可變結構域(VL)相連之重鏈可變結構域(VH)，該連接子過短而無法使同一鏈上兩個結構域之間進行配對。因此，使一個片段的VH及VL結構域與另一片段的互補VL及VH結構域進行配對，藉此形成兩個抗原結合位點。亦曾有人報導了借助單鏈Fv(sFv)二聚體來製備雙特異性抗體片段的另一策略。See Gruber等人，*J. Immunol.*, 152:5368 (1994)。

本發明亦涵蓋二價以上之抗體。例如，可製備三特異性抗體。Tutt等人，*J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

多價抗體

藉助一表現抗體所結合抗原之細胞，可使多價抗體較雙價抗體更快地內在化(及/或分解代謝)。本發明抗體可係具有三或多個抗原結合位點的多價抗體(其係IgM類之外的抗體)(例如四價抗體)，其可藉由編碼該抗體多肽鏈之核酸的

重組表現而容易地進行製備。該多價抗體或包含一個二聚體化結構域及三或多個抗原結合位點。較佳二聚體化結構域包含(或由其構成)一Fc區或一絞鏈區。在此方案中，該抗體將包含一Fc區及三或多個位於Fc區胺基末端之抗原結合位點。本文較佳多價抗體包含(或由其構成)三至約八個、但較佳四個抗原結合位點。多價抗體可包含至少一個多肽鏈(且較佳兩個多肽鏈)，其中該(等)多肽鏈包含兩或多個可變結構域。舉例而言，該(等)多肽鏈可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中VD1係一第一可變結構域，VD2係一第二可變結構域，Fc係一Fc區之多肽鏈，X1及X2代表一胺基酸或多肽，且n係0或1。舉例而言，該(等)多肽鏈可包含：VH-CH1-撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈；或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文多價抗體較佳進一步包含至少兩個(且較佳四個)輕鏈可變結構域多肽。本文多價抗體可(舉例而言)包含自約兩至約八個輕鏈可變結構域多肽。本文所涵蓋的輕鏈可變結構域多肽包含一輕鏈可變結構域及(視情況)另外包含一CL結構域。

抗體變體

在一些實施例中，涵蓋本文所述該等抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能期望改良該抗體之結合親和性及/或其他生物學特性。該抗體之胺基酸序列變體係藉由向該抗體核酸中引入適宜的核苷酸或藉由肽合成而製備。此等修飾包括(例如)該抗體胺基酸序列中殘基之刪除及/或插入及/或取代。可實施刪除、插入及取代之任一組合以

達成最終構造，前提條件為最終構造具有期望特徵。胺基酸改變可在獲得胺基酸序列時引入目標抗體胺基酸序列中。

一可用於識別抗體上係較佳誘變位置之某些殘基或區域的方法稱為"丙胺酸掃描誘變"，如 Cunningham及 Wells ((1989) Science, 244:1081-1085)中所闡述。此處，目標殘基之殘基或基團已得到鑑定(例如，帶電荷殘基，例如 arg、asp、his、lys及 glu)並由中性或帶負電荷胺基酸(最佳係丙胺酸或多丙胺酸)取代以影響胺基酸與抗原間相互作用。藉由在取代位點或對取代位點引入另外或其他變體來改良彼等對取代展現功能敏感性之胺基酸位置。故儘管用於引入胺基酸序列變體之位點需預先確定，但突變型本身之性質卻不能預先確定。例如，為分析指定位點之突變體的表現，在目標密碼子或區域處實施丙胺酸掃描誘變或隨機誘變並就期望活性對經表現之免疫球蛋白加以篩選。

胺基酸序列插入包括胺基及/或羧基-末端融合(長度介於1個殘基至含有上百或更多殘基之多肽的範圍內)以及單或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫胺醯基殘基之抗體或與細胞毒性多肽融合之抗體。抗體分子之其他插入變體包括酵素(例如針對ADEPT者)或可提高抗體血清半衰期之多肽與抗體N-或C-末端之融合體。

另一類抗體之胺基酸變體係改變抗體之原初糖基化形式。此改變包括刪除一或多個存在於抗體中之碳水化合物

部分，及/或增加一或多個在抗體中原本不存在之糖基化位點。

多肽糖基化通常係經N-連接或O-連接。N-連接意指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈的連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X係除脯胺酸外之任何胺基酸)係該碳水化合物部分與該天冬醯胺側鏈酶促連接之識別序列。因此，多肽中存在該等任一種三肽序列均可產生潛在糖基化位點。O-連接之糖基化係指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一與羥基胺基酸(最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸)的連接。

通常係藉由改變胺基酸序列以使抗體中含有一或多個上述三肽序列(作為N-連接的糖基化位點處)，而將糖基化位點輕易地加入至抗體中。亦可藉由向原始抗體序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或藉由用一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代(作為O-連接糖基化位點)來實現該改變。

當抗體包含Fc區時，可對連接至其上的碳水化合物加以改造。例如，具有與抗體Fc區相連之缺乏岩藻糖的成熟碳水化合物結構的抗體闡述於美國專利申請案第US 2003/0157108號(Presta, L.)。亦參見美國專利第2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo公司)。對於在與抗體Fc區相連之碳水化合物中具有等分N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)之抗體可參閱WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)及美國專利第6,602,684號(Umana等人)。在與抗體Fc區相連之低聚

糖中具有至少一個半乳糖殘基之抗體報導於 WO 1997/30087, Patel等人中。有關具有與抗體Fc區相連之經改造碳水化合物之抗體亦參見, WO 1998/58964(Raju, S.) 及 WO 1999/22764(Raju, S.)。關於具有經修飾之糖基化的抗原結合分子亦參見美國專利第 2005/0123546 號(umana 等人)。

本文較佳糖基化變體包含Fc區, 其中與Fc區相連之碳水化合物結構缺乏岩藻糖。此等變體具有經改良之ADCC功能。視情況, Fc區於其中進一步包含一或多處可進一步改良ADCC之胺基酸取代, 例如, Fc區 298、333及/或334位(殘基Eu編號)之取代。與"脫岩藻糖化"或"岩藻糖缺乏"抗體有關之公開案實例包括: 美國專利第 2003/0157108 號; WO 2000/61739; WO 2001/29246; 美國專利第 US 2003/0115614 號; 美國專利第 US 2002/0164328 號; 美國專利第 US 2004/0093621 號; 美國專利第 US 2004/0132140 號; 美國專利第 US 2004/0110704 號; 美國專利第 US 2004/0110282 號; 美國專利第 US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki 等人, J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki 等人, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。產生脫岩藻糖化抗體之細胞系實例包括: 存在蛋白質岩藻糖化缺陷之Lec13 CHO 細胞(Ripka 等人 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 美國專利臨時申請案第 US 2003/0157108 A1 號,

Presta, L; 及 WO 2004/056312 A1, Adams 等人, 尤其係實例 11), 及基因剔除細胞系, 諸如 α -1,6-岩藻糖基轉移酶基因 (FUT8) 剔除之 CHO 細胞 (Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))。

另一類變體係胺基酸取代變體。此等變體係抗體分子中至少一個胺基酸殘基為不同殘基所取代之變體。用於取代誘變之最受關注的位點包括超變區, 但亦涵蓋 FR 改變。保守取代示於表 1 之 "較佳取代" 標題下。若此等取代會引起生物活性之改變, 則可引入更為實質之變化 (表 1 中命名為 "實例性取代" 或如下文進一步對胺基酸種類之闡述) 並應對產物加以篩選。

表 1

最初殘基	例示取代物	較佳取代物
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

對抗體生物學性質之實質修飾可藉由選擇在保持下列特徵之作用方面顯著不同的取代來實現：(a)取代區域中多肽主鏈之結構，例如，呈折疊或螺旋構象；(b)靶位點處分子之電荷或疏水性，或(c)側鏈之大小。可根據常見側鏈性質將天然存在之殘基分為以下各類：

- (1)疏水性胺基酸：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2)中性親水胺基酸：cys、ser、thr、Asn、Gln；
- (3)酸性胺基酸：asp、glu；
- (4)鹼性胺基酸：his、lys、arg；
- (5)會影響鏈定向之殘基：gly，pro；及
- (6)芳香族胺基酸：trp、tyr、phe。

非保守性取代將需要將此等種類之一的成員調換成另一種類。

一種類型之取代變體涉及取代親本抗體的一或多個超變區殘基(例如一人類化或人類抗體)。一般而言，經篩選可用於進一步研發之所得變體相對於用來產生變體之親本抗體具有改良之生物學性質。用於產生此等取代變體之簡便方法涉及使用噬菌體展示之親和性成熟。簡言之，使若干

超變區位點(例如，6至7個位點)發生突變以在每一位點產生所有可能之胺基酸取代。如此產生之抗體當融合至包裹於每一顆粒中之M13基因III產物上時會自絲狀噬菌體顆粒展示出來。然後就本文所揭示之變體生物活性(例如結合親和性)對經噬菌體展示之變體加以篩選。為鑑定用於修飾之候選超變區位點，可實施丙胺酸掃描誘變以鑑定可明顯促進抗原結合之超變區殘基。或者或此外，有利的是分析抗原-抗體複合體之晶體結構以鑑定抗體與抗原之間的接觸點。根據本文闡述之技術此等接觸殘基及鄰近殘基係用於取代之候選殘基。產生此等變體後，即可使該組變體接受本文所述之篩選且可對在一或多種相關分析中具有優良性質之抗體加以篩選以用於進一步之研發。

可藉由各種業內已知方法來製備編碼抗體胺基酸序列變體之核酸分子。此等方法包括但不限於自天然來源分離(對於天然存在之胺基酸序列變體之情形)或藉由對早期製備之抗體變體或非變體形式進行寡核苷酸介導之(或定點)誘變、PCR誘變及序列盒誘變來製備。

人們可能期望在本發明免疫球蛋白多肽之Fc區中引入一或多個胺基酸修飾，藉此生成一Fc區變體。該Fc區變體可包含一在一或多個胺基酸位置(包括鉸鏈半胱胺酸位置)包含胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如一人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。根據此闡述及業內教示，預期在一些實施例中本發明方法中所用抗體(例如)在Fc區中與野生型對應抗體相比較可包含一或多個改變。該

等抗體仍然應保持與其野生型對應體相比較實質上相同的治療應用所需特徵。舉例而言，據認為，可Fc區中實施某些改變，其應導致改變的(即增進的或減小的)C1q結合及/或補體依賴細胞毒作用(CDC)，如WO 99/51642中所闡述。亦參見Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821；及論及Fc區變體其他實例之WO 94/29351。WO 00/42072(Presta)及WO 2004/056312(Lowman)闡述具有增進的或減小的與FcR之結合力的抗體變體。該等專利出版物之內容皆明確地以引用的方式併入本文中。亦參見Shields等人，J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。具有增加的半壽期及提高的與新生動物Fc受體(FcRn)之結合力的抗體闡述於US2005/0014934A1(Hinton等人)中，該等受體負責將母體IgG傳遞給胎兒(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994)。該等抗體包含一其中具有一或多個可改良Fc區與FcRn之結合力之取代部分的Fc區。具有改變的Fc區胺基酸序列及增加的或減小的C1q結合能力之多肽變體闡述於美國專利第6,194,551B1號及WO 99/51642。彼等專利公開案之內容皆明確地以引用的方式併入本文中。亦參見Idusogie等人，J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

抗體衍生物

可對本發明抗體進一步加以修飾以包含另外的業內已知且易於獲得的非蛋白部分。較佳地，該等適於抗體衍生化

的部分係水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)：聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三氧雜環己烷、乙烯/馬來酸酐共聚物、聚胺基酸(同聚物或無規共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇同聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化的多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於其在水中具有穩定性而易於製造。該聚合物可具有任何分子量，且可具支鏈或不具支鏈。與抗體連接的聚合物之數量可變化，且若一個以上的聚合物與之連接，其可係相同或不同的分子。一般而言，衍生所用聚合物之數量及/或類型可基於考慮包括(但不限於)擬改良抗體之特定性質及功能、是否該抗體衍生物將用於經定義條件下之治療等等而確定。

篩選具有期望性質之抗體

本發明抗體可結合FGF19，且在一些實施例中可調變一或多個FGF19-相關效應之方面，包括(但不限於)FGFR4激活、FGFR4下游分子信令、與FGF19結合的FGFR4之分裂、FGFR4多聚化、CYP7 α 1基因之表現、FGFR4、MAPK、FRS2及/或ERK2之磷酸化、 β -連環蛋白之激活、FGF19-促進的細胞遷移、及/或任何生學相關的FGF19及/或FGFR4生物學途徑之破壞、及/或腫瘤、細胞增殖病症或癌症之治療及/或預防；及/或與FGF19表現及/或活性(例如

增強的FGF19表現及/或活性)有關之病症的治療或預防。

經純化抗體可進一步藉由一系列測試進行特徵分析，包括(但不限於)：N末端序列測定、胺基酸分析、未變性大小排除高壓液相層析法(HPLC)、質譜測定法、離子交換色譜法及木瓜蛋白酶消化法。

在本發明某些實施例中，對本文所產生抗體進行生物學活性分析。在一些實施例中，對本發明抗體進行抗原結合活性測試。業內已知且可用於本文中之抗原結合測試包括(但不限於)任何使用諸如下列技術之直接或競爭性結合測試：西方墨漬分析法、放射免疫測定、ELISA(酶聯免疫吸附測定)、“夾心”免疫測定、免疫沉澱測定、螢光免疫測定及蛋白A免疫測定。例示性抗原結合測定於下文實例章節中給出。

在某些實施例中，本發明提供抗-FGF19單株抗體，其與一包含一具有序列 DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQ
DINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG
QDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR
(SEQ ID NO:4)之輕鏈可變結構域及一具有序列 QVQLKQ
SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLL
ANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID
NO:8)之重鏈可變結構域之抗體競爭結合FGF19。該等競爭者抗體包括可識別一與該抗體所識別的FGF19抗原決定部位相同或重疊的FGF19抗原決定部位的抗體。該等競爭

者抗體可藉由在與經標記抗體之競爭中與固定的FGF19之結合而對抗-FGF19雜交瘤上清液進行篩選而獲得，其中經標記抗體包含一具有序列：DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)之輕鏈可變結構域及一具有序列QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLTTLTVSA (SEQ ID NO:8)之重鏈可變結構域。與包含無關(或無)抗體之對照結合混合物中所檢測到的已結合經標記抗體之數量相比較，一包含競爭者抗體之雜交瘤上清液應可降低接受測試的競爭結合混合物中所檢測到的已結合經標記抗體之數量。本文所述該等競爭性結合測定之任一種皆適用於前述製程中。

具有本文所闡述性質之本發明抗-FGF19抗體可藉由利用任一便利方法就期望特性對抗-FGF19雜交瘤純系進行篩選而獲得。舉例而言，若一阻斷或不阻斷FGFR4與FGF19之結合的抗-FGF19單株抗體係合意的，則可在一結合競爭測定中對候選抗體進行測試。競爭測定法為業內所熟知，在實例中對一此方法進行闡述。

確定抗-FGF19抗體抑制能力之其他功能測定法係業內已知方法，本文對其中某些方法進行例示。

在一些實施例中，本發明涵蓋具有一些(但非全部)效應

子作用之經改變的抗體，此情況使其成為許多應用之合意的候選物，在該等應用中該抗體活體內半衰期很重要但某些效應子作用(例如補體及ADCC)係不必要的或有害的。在某些實施例中，對所該生免疫球蛋白之Fc活性進行量測，以確保僅保留期望特性。可實施活體外及/或活體內細胞毒性測試以證實CDC及/或ADCC活性之降低/缺失。舉例而言，可實施Fc受體(FcR)結合測試以確保該抗體缺少FcγR結合力(因此可能缺少ADCC活性)，但可保留FcRn結合能力。調介ADCC之初級細胞(NK細胞)僅表現Fc(RIII，然而單核細胞可表現Fc(RI、Fc(RII及Fc(RIII。在Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁表3中對FcR於造血細胞上之表現進行了總結。一評估目標分子ADCC活性之活體外測試實例闡述於美國專利第5,500,362號或5,821,337號。用於此等分析之可用效應細胞包括末梢血單核細胞(PBMC)及天然殺傷(NK)細胞。或者或另外，可在活體內(例如在諸如Clynes等人(*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998))所揭示之動物模型中)對目標分子之ADCC活性進行評價。亦可實施C1q結合測試來證實該抗體不能與C1q結合，並因此而缺少CDC活性。為評定補體激活，可實施CDC測試，如Gazzano-Santoro等人(*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996))所闡述。亦可使用業內已知方法來實施FcRn結合力及活體內間隙/半衰期測定。

在一些實施例中，本發明提供具有增大的效應子作用及/或增大的半衰期之經改變抗體。

載體、宿主細胞及重組方法

對於本發明抗體的重組製造，需將編碼該抗體變體的核酸分離出來並將其插入一可複製載體中用以進一步選殖(擴增DNA)或用以表現。編碼該抗體之DNA可使用常規程序容易地分離出來並定序(例如，藉由使用能與編碼該抗體之重鏈及輕鏈的基因特異結合之寡核苷酸探針)。有多種載體可以利用。載體之選擇部分取決於似使用的宿主細胞。一般而言，較佳宿主細胞係原核起源或真核起源的(通常係哺乳動物)。應瞭解，任何同種型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)皆可用於此目的，且此等恆定區可自任何人或動物種類獲得。

a. 利用原核宿主細胞生成抗體：

i. 載體構建

編碼本發明抗體多肽組份之多核苷酸序列可使用標準重組技術獲得。合意的多核苷酸序列可自諸如雜交瘤細胞等抗體產生細胞分離及測序。或者，可使用核苷酸合成器或PCR技術來合成多核苷酸。一經獲得，則將編碼多肽之序列插入能夠在原核宿主中複製及表現異源性多核苷酸之重組體載體中。許多現有或業內已知載體皆可用於本發明目的中。適宜載體之選擇應主要取決於似插入該載體中之核酸的大小及似用該載體轉化的特定宿主細胞。各載體包含多種組份，端視其功能(異源性多核苷酸之擴增或表現，或兩者)及其與其存於其中之特定宿主細胞的相容性而定。該等載體組份一般而言包括(但不限於)：複製起始

區、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源性核酸插入片段及轉錄終止序列。

一般而言，包含源自與宿主細胞可相容種類之複製子及控制序列的質粒載體係與該等宿主相結合而使用。該載體通常載有一複製位點，以及在經轉化細胞中能夠提供表型選擇之標記序列。舉例而言，通常使用 pBR322(一源自大腸桿菌類的質粒)對大腸桿菌進行轉化。pBR322 包含編碼胺苄青黴素(Amp)及四環素(Tet)抗性之基因，且因此可提供容易的鑑別經轉化細胞之方法。pBR322(其衍生物)或其他細菌質粒或噬菌體亦可包含(或經修飾而包含)可由細菌有機體用於表現內源蛋白質之啟動子。用於表現特定抗體之 pBR322 衍生物實例詳細闡述於 Carter 等人之美國專利第 5,648,237 號中。

另外，包含可與宿主微生物相容之複製子及控制序列的噬菌體載體可用作與該等宿主相結合的轉化載體。舉例而言，噬菌體(例如 λ GEM.TM.-11)可用來製造可用於轉化諸如大腸桿菌 LE392 之易感宿主細胞之重組載體。

本發明表現載體可包含兩或更多個啟動子-順反子對，編碼各多肽組份。啟動子為未經轉譯的調節順序，位於可調節其表現之順反子的上游(5')。原核啟動子通常分為兩類，誘導型及組成型。誘導型啟動子係一如下啟動子：其在對培養條件變化(例如一營養素之存在與否或一溫度變化)進行響應之調控下可起始增加水平的順反子轉錄。

大量由多種可能的宿主細胞識別的啟動子為人們所熟

知。藉由藉助限制酶消化自源DNA去除啟動子並將經分離啟動子序列插入本發明載體中，所選啟動子可以可操作方式鏈接至編碼輕鏈或重鏈的順反子DNA上。兩天然啟動子序列及許多異源性啟動子可用於指導靶基因之擴增及/或表現。在一些實施例中，使用異源性啟動子，因為當與天然目標多肽啟動子相比較時其通常可達成所表現靶基因之更大轉錄及更高產率。

適合隨原核宿主使用之啟動子包括PhoA啟動子、 β -半乳糖胺酶及乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統及雜種啟動子(例如tac或trc啟動子)。然而，在細菌中起作用的其他啟動子(例如其他已知細菌或噬菌體啟動子)亦適合。其核苷酸序列已經公開，因此熟練技工能以可操作方式使用連接子或接合子將其連接至編碼目標輕鏈及重鏈之順反子上(Siebenlist等人(1980) Cell 20: 269)以補充任何所需限制位點。

在本發明一態樣中，重組體載體中每一順反子包含一可指導所表現多肽橫過一膜之移位的分泌信號序列組份。一般而言，該信號序列可係一載體組份，或其可係插入該載體之目標多肽DNA之部分。所選用於本發明目的之信號序列應係一經宿主細胞識別及加工(即，經信號肽酶解離)者。對於不識別及加工異源性多肽天然信號序列之原核宿主細胞，藉由選自(例如)由鹼性磷酸酶、青黴素黴、Ipp、或熱穩定的腸毒素II(STII)先導部分、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP組成之群的原核信號序列取代該信號

序列。在本發明一實施例中，在表現系統之兩順反子中所用信號序列系STII信號序列或其變體。

在另一態樣中，根據本發明免疫球蛋白之產生可在宿主細胞之細胞質中發生，且因此不需要各順反子中存在分泌信號序列。就此而言，可表現、折疊及組裝免疫球蛋白輕鏈及重鏈，以在細胞質中形成功能性免疫球蛋白。某些宿主株(例如大腸桿菌trxB-株)可提供有利於二硫鍵結形成之細胞質條件，藉此達成所表現的蛋白質亞單位之正確折疊及組裝。Proba及Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995)。

適合表現本發明抗體之原核宿主細胞包括古細菌及真細菌，例如革蘭氏陰性有機體或革蘭氏陽性有機體。可用細菌之實例包括埃希桿菌屬(例如大腸桿菌)、桿菌(例如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*))、腸道細菌、假單胞菌種類(例如綠膿桿菌(*aeruginosa*))、沙門氏鼠傷寒菌(*Salmonella typhimurium*)、黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、克雷白氏桿菌(*Klebsiella*)、變形菌(*Proteus*)、志賀氏桿菌(*Shigella*)、根瘤菌(*Rhizobia*)、透明顫菌屬(*Vitreoscilla*)或副球菌屬(*Paracoccus*)。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，本發明用大腸桿菌細胞作為宿主。大腸桿菌株之實例包括菌株W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, 第2卷 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190至1219頁；ATCC 儲存號27,325)及其衍生物，包括具有基因型W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpr-

fepE) degP41 kanR之菌株33D3(美國專利第5,639,635號)。其他株及其衍生物，例如大腸桿菌294 (ATCC 31,446)、大腸桿菌B、大腸桿菌 λ 1776 (ATCC 31,537)及大腸桿菌RV308 (ATCC 31,608)亦係適合的。該等實例係說明性的而非限制性的。用於構建上述任何具有所定義基因型細菌之衍生物的方法係業內已知方法並闡述於(例如)Bass等人，Proteins, 8:309-314 (1990)。通常需要考慮複製子在細菌細胞中之可複製性而對適宜細菌進行選擇。舉例而言，當用習知質粒(例如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410)供給複製子時，大腸桿菌、黏質沙雷氏菌或沙門氏菌種類可能適合用作宿主。通常，宿主細胞應可分泌最小量的蛋白水解酶，並可合意地向該細胞培養基中加入另外蛋白酶抑制劑。

ii. 抗體產生

用上述表現載體對宿主細胞實施轉化，並在習用營養培養基中對其實施培養，其中該營養培養基經修飾為適合於誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼期望序列之基因。

轉化指將DNA引入原核宿主中以便能作為染色體外成份或藉由染色體整合來複製該DNA。端視所用宿主細胞，轉化係使用使用對此等細胞適宜的標準技術完成。採用氯化鈣之鈣治療通常用於包含堅固的細胞壁障壁之細菌細胞。另一轉化方法採用聚乙二醇/DMSO。所用再一技術係電穿孔。

用於產生本發明多肽之原核細胞在業內已知且適於培養

所選宿主細胞之培養基中進行培養。適宜培養基之實例包括 luria 肉湯 (LB) 加上必需營養素增補物。在一些實施例中，該介質亦包含一選擇劑 (基於表現載體之構造而選定) 以選擇性的達成包含表現載體之原核細胞之生長。舉例而言，向用於培養可表現抗胺苄青黴素基因之細胞的培養基中添加胺苄青黴素。

亦可以適宜濃度包括除碳、氮及無機磷酸鹽源之外的任何必需增補物，單獨引入或作為與另一增補物或培養基之混合物 (例如一複合氮源) 引入。視情況，該培養基可包含一或多種選自由麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、硫膠質、二硫赤蘚糖醇及二硫蘇糖醇組成之群的還原劑。

在適宜溫度下對原核宿主細胞進行培養。對於大腸桿菌生長，舉例而言，較佳溫度範圍自約 20°C 至約 39°C、更佳自約 25°C 至約 37°C，甚至更佳係約 30°C。培養基之 pH 值可係範圍自約 5 至約 9 之任一 pH 值，主要視宿主有機體而定。對於大腸桿菌，pH 值較佳為自約 6.8 至約 7.4，且更佳約 7.0。

若在本發明表現載體中使用一誘導型啟動子，則在適於激活該啟動子之條件下誘導蛋白質表現。在本發明一態樣中，PhoA 啟動子係用於控制多肽轉錄。因此，經轉化宿主細胞係在磷酸鹽限定的誘導培養基中進行培養。較佳地，該磷酸鹽限定的培養基係 C.R.A.P 培養基 (參見，例如，Simmons 等人，J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147)。根據所採用載體構造，可使用多種其他誘導物，如

業內所瞭解。

在一實施例中，所表現的本發明多肽係分泌至宿主細胞周質中再自其中回收。蛋白質回收通常破裂該微生物，通常係藉由諸如滲透壓休克、超音波處理或溶解等方式實施。細胞一經破裂後，則藉由離心或過濾去除細胞碎片或完整細胞。可對蛋白質實施進一步提純，例如藉由親和樹脂層析法實施。或者，可將蛋白質轉移至培養基中並在其中實施分離。可自培養基中移除細胞，並對培養基上清液實施過濾及濃縮以便對所產生蛋白進行進一步純化。所表現的多肽可經進一步分離及識別使用通常已知方法例如聚丙烯醯胺凝膠電泳法(PAGE)及西方印跡分析法。

在本發明一態樣中，抗體產生係藉由發酵製程大批量地實施。有多種大規模補料分批發酵製程可用於產生重組蛋白。大規模發酵具有至少1000公升之容量，較佳具有約1,000至100,000公升之容量。該等發酵罐使用攪拌葉輪來分配氧及營養素、尤其葡萄糖(較佳的碳/能源)。小規模發酵通常指在一不超過約100公升容積、且可係自約1公升至約100公升容積之發酵罐中進行的發酵。

在一發酵方法中，蛋白質表現之誘導通常在該等細胞已在適合條件下生長至期望密度(例如，一約180-220之OD₅₅₀)後起始，在此階段中該等細胞處於早穩定期。根據所採用的載體構造，可使用多種誘導物，如業內已知及上文所闡述。可在對細胞實施較短時間誘導之後再進行誘導。通常對細胞實施約12至50小時誘導，然而亦可使用更

長或更短的誘導時間。

為提高本發明多肽的產品收得率及質量，可對多種發酵條件實施修改。舉例而言，為提高所分泌抗體多肽之正確裝配及折疊，可利用過表現伴侶蛋白之額外的載體來共轉化宿主原核細胞，該等額外載體例如 Dsb 蛋白 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 及 / 或 DsbG) 或 FkpA (一具有伴侶活性的肽基脯胺醯基順, 反異構酶)。該等伴侶蛋白已經顯示在細菌宿主細胞中有助於所產生異源性蛋白之正確折疊與溶解。Chen 等人 (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605 ; Georgiou 等人美國專利第 6,083,715 號 ; Georgiou 等人，美國專利第 6,027,888 號 ; Bothmann 及 Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 ; Ramm 及 Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 ; Arie 等人 (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210。

為使所表現異源性蛋白之蛋白水解作用最小化 (尤其彼等在蛋白水解方面敏感者)，在本發明中可使用某些缺乏蛋白水解酶之宿主株。舉例而言，可對宿主細胞株進行修飾以影響編碼已知細菌蛋白酶 (例如蛋白酶 III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶 I、蛋白酶 Mi、蛋白酶 V、蛋白酶 VI 及其組合) 之基因中的基因突變。一些大腸桿菌蛋白酶缺乏株可採用並闡述於 (例如) Joly 等人 (1998)，上文 ; Georgiou 等人，美國專利第 5,264,365 號 ; Georgiou 等人，美國專利第 5,508,192 號 ; Hara 等人，*Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996)。

在一實施例中，在本發明表現係統中使用缺乏蛋白水解酶且用過表現一或多種伴侶蛋白之質粒轉染的大腸桿菌株作為宿主細胞。

iii. 抗體提純

可採用業內已知標準蛋白質提純法。以下程序係對適宜提純程序進行舉例：在免疫親和或離子交換柱上進行分級分離、乙醇沉澱法、反相HPLC、在二氧化矽上或在陽離子交換樹脂(例如DEAE)上進行的層析法、色譜聚焦法、SDS-PAGE、硫酸銨沉澱法及凝膠過濾(使用(例如)葡聚糖凝膠G-75)。

在一態樣中，將固定於一固相上之蛋白A用於對本發明全長抗體產物之免疫親和純化。蛋白A係一取自金黃色葡萄球菌之可以高親和性與抗體Fc區結合的41 kD細胞壁蛋白質。Lindmark等人(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。固定蛋白A之固相較佳係包含玻璃或二氧化矽表面之柱，更佳係可控多孔玻璃柱或矽酸柱。在一些應用中，已用一試劑(例如甘油)對該柱實施塗覆以防止污染物之非特異性黏附。

當第一步提純時，將上述源自細胞培養基之製品塗覆至固定有蛋白A之固相上以達成目標抗體與蛋白A之特異性結合。隨後對該固相實施洗滌以去除與該固相非特異性結合的污染物。最終，目標抗體係藉由洗脫而自該固相中回收。

b. 使用真核宿主細胞生成抗體：

該等載體組份一般而言包括(但不限於)一或多種下列組份：一信號序列、一複製起始區、一或多個標記基因、一增強子元件、一啟動子及一轉錄終止序列。

(i) 信號序列組份

一用在真核宿主細胞中的載體亦可在目標成熟蛋白或多肽之N末端包含一信號序列或具有一特定切割位點之其他多肽。所選異源性信號序列較佳係一由宿主細胞識別及加工(即，藉助信號肽酶分開)者。在哺乳動物細胞表現中，可獲得哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導物，例如單純皰疹gD信號。

此前體區之DNA在閱讀框中與編碼抗體之DNA結合。

(ii) 複製起始區

一般而言，哺乳動物表現載體不需要複製起始區組份。舉例而言，通常僅使用SV40起始區，此乃因其包含早期啟動子。

(iii) 選擇基因組份

表現及選殖載體可包含一選擇基因，亦稱為可選標記。典型選擇基因編碼具有如下功能的蛋白質：(a)賦予對抗生素或其他毒素(例如胺苄青黴素、新黴素、胺甲蝶呤或四環素)之抗性，(b)補足營養缺乏(在關聯處)，或(c)供應自複合培養基中無法得到的關鍵營養素。

一篩選方案實例可利用一藥物來阻止宿主細胞之生長。彼等用一異源基因成功轉化的細胞可產生一賦予藥物抗性之蛋白並因此可在該篩選制度中存活下來。此顯性性狀篩

選使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素。

哺乳動物細胞適宜可選標記之另一實例係彼等能夠鑑別競爭性吸收抗體核酸(例如DHFR)、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及-II、較佳靈長類金屬硫蛋白基因、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等之細胞者。

舉例而言，藉由在一包含胺甲蝶呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗物)之培養基中培養全部轉化株，首先鑑別出用DHFR選擇基因轉化的細胞。當採用野生型DHFR時一適宜宿主細胞為缺乏DHFR活性的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如ATCC CRL-9096)。

或者，用編碼一抗體、野生型DHFR蛋白及另一可選標記(例如胺基葡萄糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))之DNA序列轉化或共轉化的宿主細胞(尤其包含內源性DHFR之野生型宿主細胞)可藉由在包含該可選標記之選擇劑(例如一胺基糖苷類抗生物素，如卡那黴素、新黴素或G418)的培養基中實施細胞培養而進行選擇。參見美國專利第4,965,199號。

(iv) 啟動子組份

表現及選殖載體通常包含一由宿主有機體識別且以可操作方式連結至抗體多肽核酸上之啟動子。對於真核生物而言，啟動子序列係已知的。實際上，全部真核生物基因皆具有一AT豐富區，其位於轉錄起始位點上游大約25至30個鹼基處。許多基因轉錄開始點上游70至80個鹼基處發現的另一序列係一CNCAAT區，其中N可係任一核苷酸。在大

部分真核基因之3'端處為一AATAAA序列，其可能係向該編碼序列3'端添加聚A尾之信號。全部該等序列皆適宜地插入真核生物表現載體中。

在哺乳動物宿主細胞中抗體多肽自載體之轉錄係藉由(例如)自病毒(例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳頭瘤病毒、鳥類肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、乙型肝炎病毒及猿猴病毒40(SV40))基因組、自異源性哺乳動物啟動子(例如肌動蛋白啟動子或一免疫球蛋白啟動子)、自熱休克啟動子(前提條件係該等啟動子可與該等宿主細胞系統相容)獲得的啟動子加以控制。

SV40病毒之早期及晚期啟動子係便利地呈一亦包含該SV40病毒複製起始區之SV40限制性片段形式獲得。人巨細胞病毒之立即早期啟動子係便利地呈一HindIII E限制性片段形式獲得。一用牛乳頭瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主中表現DNA之系統揭示於美國專利第4,419,446號中。一此系統之變體闡述於美國專利第4,601,978號中。或者，可將勞氏肉瘤病毒長末端基因重複用作啟動子。

(v) 增強子元件組份

藉由將一增強子序列插入載體，經常可增進編碼本發明抗體多肽之DNA藉助高級真核生物之轉錄。當前已知許多增強子序列係來自哺乳動物基因(珠蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白及胰島素)。然而，通常應使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括：位於複製起點遲側上的SV40增強子(bp 100-270)、巨細胞病毒早期啟動子增強

子、位於複製起點遲側上的多瘤病毒增強子及腺病毒增強子。關於用於激活真核生物啟動子之增強元件亦參見 Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)。增強子可在該抗體多肽編碼序列之5'或3'位處接入載體，但較佳係位於啟動子之5'位。

(vi) 轉錄終止組份

真核宿主細胞中所用表現載體通常亦應包含為終止轉錄及為穩定mRNA所必需的序列。此等序列通常可自真核生物或病毒DNA或cDNA之5'及(偶而)3'未翻譯區獲得。該等區包含在編碼抗體之mRNA的未翻譯部分中轉錄為聚腺苷酸化片段的核苷酸節段。一可用的轉錄終止組份係牛生長激素聚腺苷酸化區。參見WO 94/11026及本文揭示的表現載體。

(vii) 宿主細胞之選擇及轉化

適於在本文載體中選殖或表現DNA之宿主細胞包括本文所述高級真核生物細胞，包括脊椎動物宿主細胞。脊椎動物細胞在培養(組織培養)中繁殖已成為慣用製程。可用哺乳動物宿主細胞系之實例係：經SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)轉化的猴腎CV1品系；人類胚腎品系(用於在懸浮培養物中培養的293或293細胞，Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼侖鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR (CHO, Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠塞爾托利(sertoli)細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎

細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5 細胞；FS4 細胞；及人類肝瘤品系(Hep G2)。

用上述用於抗體產生之表現或選殖載體對宿主細胞實施轉化，並在經修改適於誘導啟動子、選擇轉化株或擴增編碼期望序列之基因的習用營養培養基中進行培養。

(viii) 培養宿主細胞

用於產生本發明抗體之宿主細胞可在多種培養基中進行培養。可購得培養基(例如Ham's F10 (Sigma)、最小必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)及達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM)，Sigma))適於培養該等宿主細胞。另外，闡述於下列文獻中之任何培養基皆可用作該等宿主細胞之培養基：Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)，Barnes等人，Anal. Biochem.102:255 (1980)，美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或再公告美國專利第30,985號。可按需要向任一該等培養基中增補激素及/或其他生長因子(例如胰島

素、鐵傳遞蛋白或表皮生長因子)、鹽類(例如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝劑(例如 HEPES)、核苷酸(例如腺苷及胸苷)、抗生素(例如 GENTAMYCIN™ 藥物)、微量元素(界定為通常以微莫耳範圍之最終濃度存在的無機化合物)及葡萄糖或一等效能源。亦可以彼等業內熟練的技術人員所瞭解之適宜濃度包含任何其他必需增補物。培養條件(例如溫度、pH值及諸如此類)係先前隨經選擇用於表現之宿主細胞使用之彼等，且應係一般技術人員所熟知之條件。

(ix) 抗體提純

當使用重組技術時，抗體可在細胞內產生或直接分泌至培養基中。若該抗體係在細胞內產生，作為一第一步驟，舉例而言，藉由離心法或超濾法去除微粒殘渣(宿主細胞或溶解了的片段)。當抗體係分泌至培養基中時，通常首先使用一可購得之蛋白質濃縮濾器(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超過濾裝置)對取自該等表現系統之上清液實施首次濃縮。在任一前述步驟中皆可使用蛋白酶抑制劑(例如 PMSF)來抑制蛋白酶解，且可使用抗生素來防止外來污染物之生長。

自該等細胞製備的抗體組合物可使用(例如)羧基磷灰石層析法、凝膠電泳、透析及親和層析法進行提純，其中親和層析法係較佳提純技術。蛋白 A 作為親和配體之適合性取決於抗體中存在的任一免疫球蛋白 Fc 結構域之種類及同種型。蛋白 A 可用來純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈的

抗體(Lindmark等人, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。推薦將G蛋白質用於所有小鼠同種型及用於人類 $\gamma 3$ (Guss等人, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。附加親和配體之基質最經常係瓊脂糖, 但其他基質亦可用。具有機械穩定性的基質(例如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯以瓊脂糖相皆比較可達成更快的流速及更短的處理時間。當該抗體包含CH3結構域時, 可用Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)進行提純。其他蛋白質提純技術(例如在一離子交換柱上之分級分離、乙醇沉澱、反相高壓液相層析法、於二氧化矽上實施的層析法、於肝素SEPHAROSE™上實施的層析法、於陰離子或陽離子交換樹脂(例如聚天門冬胺酸柱)上實施的層析法、色譜聚焦法、SDS-PAGE及硫酸銨沉澱)皆亦可端視擬回收抗體而使用。

繼任何初步淨化步驟後, 可使用一pH介於約2.5至4.5之洗脫緩衝劑對包含目標抗體及污染物之混合物實施低pH值疏水作用層析, 較佳在低鹽濃度(例如自約0至0.25 M鹽)下實施。

免疫偶聯物

本發明亦提供免疫偶聯物(可互換地稱為"抗體-藥物偶聯物"或"ADC"), 其包含任一與細胞毒性劑(例如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如一細菌、真菌、植物、或動物來源之酶促活性毒素, 或其片段)或放射性同位素(即, 放射性偶聯物))偶聯的本文所述抗-FGF19抗

體。

抗體-藥物偶聯物用於局部遞送細胞毒性或細胞生長抑制劑之用途(即在癌症治療中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)(Syrigos及Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614 ; Niculescu-Duvaz及Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172 ; 美國專利第4,975,278號)可達成藥物部分向腫瘤之定向遞送及於其中之細胞內積聚，其中該等未偶聯藥劑之全身用藥可能導致不合格水平的對正常細胞以及欲清除之腫瘤細胞之毒性(Baldwin等人，(1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05 ; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," 於 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* 中，A. Pinchera等人(編輯)，第475至506頁)。由此獲得具有最小毒性的最大效能。據報告多株抗體及單株抗體兩者皆可用於該等策略中(Rowland等人，(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。在該等方法中所用藥物包括道諾黴素(daunomycin)、多柔比星、胺甲蝶呤、及長春地辛(Rowland等人，(1986) 上文)。抗體毒素偶聯物中所用毒素包括：細菌毒素(例如白喉毒素)、植物毒素(例如蓖麻毒)、小分子毒素(例如格爾德黴素(geldanamycin))(Mandler等人(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581 ; Mandler等人，(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 ; Mandler等人(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、類美登素類

(EP 1391213 ; Liu等人, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)及卡奇黴素(calicheamicin)(Lode等人(1998) Cancer Res. 58:2928 ; Hinman等人(1993) Cancer Res. 53:3336-3342)。該等毒素可藉由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制等機制來影響其細胞毒性及細胞生長抑制效應。一些細胞毒性藥物當與大的抗體或蛋白質受體配體偶聯時往往無活性或具很小活性。

ZEVALIN® (替伊莫單抗(ibrutinomab tiuxetan)、Biogen/Idec)為一抗體-放射性同位素偶聯物,其由藉且硫脲連接子-螯合劑結合的一定向抑制於正常及惡性B淋巴細胞表面上發現的CD20抗原之鼠IgG1 κ 單株抗體及¹¹¹In或⁹⁰Y放射性同位素構成(Wiseman等人(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77 ; Wiseman等人(2002) Blood 99(12):4336-42 ; Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63 ; Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。儘管ZEVALIN具有抑制B細胞非霍奇金氏(Hodgkin's)淋巴瘤(NHL)之活性,但投藥可在大多數患者中導致嚴重的及延長的血細胞減少症。MYLOTARG™ (吉妥單抗(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals) (一抗體藥物偶聯物,由一與卡奇黴素連接的hu CD33抗體構成)於2000年經核可用於藉由注射治療急性髓細胞樣白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686 ; 美國專利第4970198號 ; 第5079233號 ; 第5585089號 ; 第5606040號 ; 第5693762號 ; 第5739116號 ; 第5767285號 ; 第5773001

號)。Cantuzumab mertansine(Immunogen公司)(一抗體藥物偶聯物，由經由二硫鍵結SPP與類美登素藥物部分(DM1)連接的huC242抗體構成)正進入用於治療表現CanAg之癌症(例如結腸癌、胰腺癌、及其他癌症)的II期試驗。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen公司)(一抗體藥物偶聯物，由與類美登素藥物部分(DM1)連接的抗-前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體構成)正在用於前列腺腫瘤之可能療法的開發中。奧雷司他汀(auristatin)肽、奧雷司他汀E(AE)及單甲基奧雷司他汀(MMAE)(合成的多拉司他汀類似物)係偶聯至嵌合單株抗體cBR96(對腫瘤上之Lewis Y具特異性)及cAC10(對血液惡性腫瘤上之CD30具特異性)(Doronina等人(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)且正處於治療用途開發中。

可用於生成免疫偶聯物之化學治療劑在本文中進行闡述(例如上文所述)。可用酶促活性毒素及其片段包括：白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒蛋白A鏈、葫蘆根毒素A鏈、 α -八疊球菌、油桐蛋白質、石竹素蛋白質、美洲商陸蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、瀉果素、巴豆毒素、皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制劑、白樹毒素、絲裂吉菌素(mitogellin)、侷限麴菌素、酚黴素、依諾黴素及單端孢黴烯族毒素類。參見(例如)1993年10月28日公開的WO 93/21232。多種放射性核素對於生產放射性偶聯的抗體係有效的。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。抗

體與細胞毒性劑之偶聯物係使用多種雙功能蛋白質結合劑製得，例如3-(2-吡啶二巰基)丙酸N-羥基琥珀醯亞胺酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(例如己二醯亞胺二甲酯HCl)、活性酯類(例如辛二酸二琥珀醯亞胺基酯)、醛(例如戊二醛)、雙疊氮基化合物(例如雙(對-疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(例如雙-(對-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯類(例如2,6-二異氰酸甲苯酯)、及雙-活化氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻毒素免疫毒素可按 Vitetta 等人 (Science, 238: 1098 (1987))所述進行製備。經碳-14標記的1-異硫氰酸根合苄基-3-甲基二亞乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)係放射性核苷酸與抗體偶聯的例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

本文亦涵蓋一抗體與一或多個小分子毒素(例如卡奇黴素、類美登素類、多拉司他汀類、aurostatins、單端孢黴烯及CC1065以及具有毒素活性之該等毒素之衍生物)之偶聯物。

i. 美登素及類美登素類

在一些實施例中，免疫交聯物包括與一或多個類美登素分子偶聯之本發明抗體(全長或片段)。

類美登素類係藉由抑制管蛋白聚合而起作用的有絲分裂抑制劑。美登素最初係自東非灌木齒葉美登木分離出來(美國專利第3,896,111號)。隨後，據發現，某些微生物亦產生類美登素類，例如美登醇及C-3美登醇酯類(美國專利

第 4,151,042 號)。合成的美登醇及其衍生物及類似物揭示於(例如)美國專利第 4,137,230 號；第 4,248,870 號；第 4,256,746 號；第 4,260,608 號；第 4,265,814 號；第 4,294,757 號；第 4,307,016 號；第 4,308,268 號；第 4,308,269 號；第 4,309,428 號；第 4,313,946 號；第 4,315,929 號；第 4,317,821 號；第 4,322,348 號；第 4,331,598 號；第 4,361,650 號；第 4,364,866 號；第 4,424,219 號；第 4,450,254 號；第 4,362,663 號；及第 4,371,533 號。

類美登素藥物部分係抗體藥物偶聯物中吸引藥物部分，此乃因其係：(i)相對地易於藉由發酵或化學改質、發酵產物之衍生化進行製備，(ii)可順從地用適於經由非二硫鍵結與抗體偶聯之官能基進行衍生化，(iii)在血漿中係穩定的，且(iv)可有效抑制多種腫瘤細胞系。

包含類美登素類之免疫偶聯物、製備其之方法、及其治療用途揭示於(例如)美國專利第 5,208,020 號、第 5,416,064 號及歐洲專利第 EP 0 425 235 B1 號，其揭示內容明確地以引用的方式併入本文中。Liu 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996))闡述多種免疫偶聯物，其包含一連接至定向抑制人類結腸直腸癌之單株抗體 C242 的類美登素命名之 DM1。據發現，該偶聯物對培養的結腸癌細胞具有強細胞毒性，且在一活體內腫瘤生長分析中顯示抗腫瘤活性。Chari 等人(Cancer Research 52:127-131 (1992))闡述了多種免疫偶聯物，其中類美登素係經由二硫鍵結與位於

人類結腸癌細胞系上之抗原結合的鼠抗體A7偶聯，或與可結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠單株抗體TA.1偶聯。於活體外在人類乳腺癌細胞系SK-BR-3上對TA.1-類美登素偶聯物之細胞毒性進行了測試，其顯示 3×10^5 HER-2表面抗原/細胞。該藥物偶聯物達成了一與游離類美登素藥物相似之細胞毒性程度，其可藉由增大每個抗體分子上類美登素分子的數目而增大。A7-類美登素偶聯物在小鼠中顯示了低全身性細胞毒性。

抗體-類美登素偶聯物係藉由在未顯著減小抗體或類美登素分子之生物活性的前提下使一抗體以化學方式與類美登素分子連接而製備。參見(例如)美國專利第5,208,020號，其揭示內容以引用的方式明確地併入本文中。平均3至4個與抗體分子偶聯的類美登素分子已經顯示出增強對目標細胞之細胞毒性的效能且未對抗體之功能及溶解度產生不利影響，儘管甚至預計1毒素分子/抗體即可使細胞毒性增強超過使用裸抗體。類美登素類為業內所熟知者且可藉由已知技術合成或自天然資源分離得到。適合的類美登素類揭示於(例如)美國專利第5,208,020號及上文所引用之其他專利及非專利出版物中。較佳類美登素類係美登醇及在美登醇分子之芳族環中或在其他位置經改進的美登醇類似物，例如多種美登醇酯類。

有許多業內已知連接基團可用於製造抗體-類美登素偶聯物，包括(例如)美國專利第5,208,020號或歐洲專利第0 425 235 B1號、Chari等人(Cancer Research 52:127-131

(1992))及美國專利申請案第10/960,602號(2004年10月8日提出申請)中所揭示之彼等，該等文獻之揭示內容皆以引用的方式明確地併入本文中。包含連接體組份SMCC之抗體-類美登素偶聯物可按照美國專利申請案第10/960,602號(2004年10月8日提出申請)所揭示方法進行製備。該等鏈接基團包括二硫基、酸不穩定性基團、不耐光基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團，如上文所確定的專利中所揭示，二硫鍵結及硫醚基團較佳。另外的連接基團在本文中進行闡述及例示。

抗體與類美登素之偶聯物係使用多種雙功能蛋白質結合劑製得，例如3-(2-吡啶二巰基)丙酸N-羥基琥珀醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(例如己二醯亞胺二甲酯HCl)、活性酯類(例如辛二酸二琥珀醯亞胺基酯)、醛(例如戊二醛)、雙疊氮基化合物(例如雙(對-疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(例如雙-(對-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯類(例如2,6-二異氰酸甲苯酯)、及雙-活化氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。尤佳結合劑包括3-(2-吡啶二巰基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(SPDP)(Carlsson等人，Biochem. J. 173:723-737 (1978))及4-(2-吡啶巰基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯(SPP)以提供二硫鍵結。

端視連接類型，該連接體可在多個位點與類美登素分子結合。舉例而言，藉由使用慣用偶聯技術與羥基反應可形

成酯連接。該反應可在以下位置發生：具有一羥基之C-3位置、具有一羥甲基之C-14位置、具有一羥基之C-15位置及具有一羥基之C-20位置。在一較佳實施例中，該連接係在美登醇或一美登醇類似物之C-3位置形成。

ii. 奧雷司他汀類及多拉司他汀類

在一些實施例中，該免疫交聯物包含一偶聯至多拉司他汀類或多拉司他汀肽類似物及衍生物(奧雷司他汀類)(美國專利第5635483號；第5780588號)之本發明抗體。多拉司他汀類及奧雷司他汀類已經顯示會干擾微管動力、GTP水解作用、及核的及細胞的分離(Woyke等人(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)且具有抗癌劑活性(美國專利第US 5663149號)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。多拉司他汀或奧雷司他汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端連接至該抗體(WO 02/088172)。

例示性奧雷司他汀實施例包括N端連接的單甲基奧雷司他汀藥物部分DE及DF，揭示於"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"(美國專利序列號第10/983,340號，2004年11月5日提出申請)中，其揭示內容皆以引用的方式明確地全部併入本文中。

通常，基於肽之藥物部分可藉由在兩或更多個胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵結而製備。該等肽鍵結可(例如)根據肽化學領域中所熟知的液相合成法(參見E. Schröder及K.

Lübke, "The Peptides", 第 1 卷, 第 76 至 136 頁, 1965, Academic Press) 製備。奧雷司他汀/多拉司他汀藥物部分可根據以下文件中之方法製備: 美國專利第 US 5635483 號; 美國專利第 US 5780588 號; Pettit 等人 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit 等人 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R. 等人 Synthesis, 1996, 719-725; 及 Pettit 等人 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863。亦參見 Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 美國專利序列號第 10/983,340 號, 於 2004 年 11 月 5 日提出申請, 其全部內容皆以引用的方式併入本文中(揭示(例如)製備與連接體偶聯的單甲基纈氨酸化合物(例如 MMAE 及 MMAF)之連接體及方法)。

iii. 卡奇黴素

在其他實施例中, 該免疫交聯物包含與一或多個卡奇黴素分子偶聯的本發明抗體。卡奇黴素家族之抗生素能夠產生亞皮莫耳濃度的雙鏈 DNA。對於卡奇黴素家族偶聯物之製備, 參見美國專利第 5,712,374 號、第 5,714,586 號、第 5,739,116 號、第 5,767,285 號、第 5,770,701 號、第 5,770,710 號、第 5,773,001 號、第 5,877,296 (皆屬於 American Cyanamid 公司)。可用卡奇黴素結構類似物包括(但不限於): γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙醯基- γ_1^I 、PSAG 及 θ_1^I (Hinman 等人, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode 等人, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 及上文提

及的屬於 American Cyanamid 之美國專利申請案)。該抗體可偶聯的另一抗腫瘤藥物係葉酸拮抗劑 QFA。卡奇黴素及 QFA 兩者皆具有細胞內作用位點且不易於越過質膜。因此，經由抗體介導的細胞內攝作用細胞對該等作用物之攝取可大大增強其細胞毒性效應。

iv. 其他細胞毒性劑

可與本發明抗體偶聯的其他抗腫瘤劑包括 BCNU、胺苯磺胺、長春新鹼及 5-氟尿嘧啶，美國專利第 5,053,394 號、第 5,770,710 號中所闡述之統稱為 LL-E33288 複合物之作用劑家族、以及埃斯培拉黴素類(美國專利第 5,877,296 號)。

可用酶促活性毒素及其片段包括：白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素 A 鏈、蓖麻毒素 A 鏈、相思豆毒蛋白 A 鏈、葫蘆根毒素 A 鏈、 α -八疊球菌、油桐蛋白質、石竹素蛋白質、美洲商陸蛋白質(PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜抑制劑、瀉果素、巴豆毒素、皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制劑、白樹毒素、絲裂吉菌素(mitogellin)、侷限麴菌素、酚黴素、依諾黴素及單端孢黴烯族毒素類。參見(例如)1993 年 10 月 28 日公開的 WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋在抗體與具有溶核活性之化合物(例如核糖核酸酶或 DNA 內切核酸酶，如脫氧核糖核酸酶；DNase)之間形成的免疫交聯物。

對於腫瘤之選擇性破壞，該抗體可包含一高放射性原子。有多種放射性同位素可用於生產放射性偶聯抗體。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、

Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu的放射性同位素。當該偶聯物係用於檢測時，其可包含一用於閃爍法研究之放射性原子，例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ，或一用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為核磁共振影像學，mri)之旋光標記物，例如碘-123(再次)、碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

該放射性的或其他標記物可以已知方法納入該偶聯物中。舉例而言，該肽可係生物合成的或可藉由使用適宜胺基酸前體(包括(例如)氟-19)替代氫之化學胺基酸合成而合成。標記物(例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及 In^{111})在該肽中可經由半胱胺酸殘基結合。釷-90可經由離胺酸殘基結合。IODOGEN方法(Fraker等人 (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)可用來納入碘-123。"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy"(Chatal, CRC Press 1989)對其他方法進行詳細闡述。

抗體與細胞毒性劑之偶聯物係使用多種雙功能蛋白質結合劑製得，例如3-(2-吡啶二巰基)丙酸N-羥基琥珀醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(例如己二醯亞胺二甲酯HCl)、活性酯類(例如辛二酸二琥珀醯亞胺基酯)、醛(例如戊二醛)、雙疊氮基化合物(例如雙(對-疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(例如雙-(對-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯類(例如2,6-二異氰酸甲苯酯)、及雙-活化氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-

二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可按 Vitetta 等人 (Science 238:1098 (1987)) 所闡述進行製備。經碳-14標記的 1-異硫氰酸根合苄基-3-甲基二亞乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 係放射性核苷酸與抗體偶聯的例示性螯合劑。參見 WO 94/11026。該連接體可係一有利於該細胞毒性藥物在細胞內釋放之"可分裂連接體"。例如，可使用酸-不穩定性連接體、肽酶敏感性連接體、不耐光連接體、二甲基連接體或包含二硫鍵結之連接體 (Chari 等人, Cancer Research 52:127-131 (1992); 美國專利第 5,208,020 號)。

本發明化合物明確地涵蓋(但不限於)用於以下交聯體試劑製備的 ADC: BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代-EMCS、硫代-GMBS、硫代-KMUS、硫代-MBS、硫代-SIAB、硫代-SMCC 及硫代-SMPB，及 SVSB((4-乙烯基磺)苯甲酸琥珀鹽亞胺基酯，可購自(例如) Pierce Biotechnology 公司，Rockford, IL., U.S.A)。參見：第 467 至 498 頁，2003-2004 Applications Handbook and Catalog。

v. 抗體藥物偶聯物之製備

在本發明抗體藥物偶聯物 (ADC) 中，一抗體 (Ab) 經由一連接體 (L) 與一或多個藥物部分 (D) (例如每個抗體約 1 至約 20 個藥物部分) 偶聯。式 I 之 ADC 可採用彼等業內熟練的技術人員所瞭解的有機化學反應、條件及試劑藉由若干途徑進行製備，該等途徑包括：(1) 使抗體之親核基團與二價連

接體試劑反應，以經由共價鍵結形成Ab-L，隨後與藥物部分D反應；及(2)使一藥物部分之親核基團與二價連接體試劑反應，以經由共價鍵結形成D-L，隨後與抗體之親核基團反應。本文對製備ADC之其他方法進行闡述。



該連接體可由一或多個連接體組份構成。例示性連接體組份包括：6-馬來醯亞胺己醯基("MC")、馬來醯亞胺丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對-胺基苯甲氧羰基("PAB")、4-(2-吡啶巰基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯("SPP")、4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1N-琥珀醯亞胺酯("SMCC")及(4-碘代-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯("SIAB")。其他連接體組份為業內所瞭解且其中某些於本文中進行闡述。亦參見"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"，美國專利序列號第10/983,340號(於2004年11月5日提出申請)，其全部內容皆以引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，該連接體可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接體組份包括：二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接體組份之胺基酸殘基包括天然產生之彼等，以及較小胺基酸類及非天然產生之胺基酸類似物，例如瓜胺酸。胺基酸連接體組份可在其選擇性方面經設計及最優

化以便藉由特定酵素(例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C與D或一胞漿素蛋白酶)進行酶切。

抗體上親核基團包括(但不限於)：(i) N末端胺基，(ii)側鏈胺基，例如離胺酸，(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸，及(iv)糖羥基或胺基(其中該抗體係經糖基化的)。胺基、硫醇、及羥基係親核基團且能夠與位於連接體部分及連接體試劑上之親電子基團反應形成共價鍵結，該等連接體部分及連接體試劑包括：(i)活性酯類，例如NHS酯類、HOBt酯類、鹵代甲酸酯及醯鹵；(ii)烷基及苄基鹵化物，例如鹵代乙醯胺；(iii)醛類、酮類、羧基及馬來醯亞胺基團。某些抗體具有可還原鏈間二硫鍵結，即半胱胺酸橋接。抗體可藉由經諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理而具有與連接體試劑偶聯的反應性。在理論上，各半胱胺酸胺酸橋接應因此而形成兩反應性硫醇親核物。經由可實現胺基向硫醇轉換之離胺酸與2-亞胺基硫雜環戊烷(特勞特氏(Traut's)試劑)之反應可將另外親核基團引入抗體。藉由引入一個、兩個、三個、四個、或更多個半胱胺酸殘基(例如製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之突變型抗體)，可將反應性硫醇基引入該抗體(或其片段)。

本發明抗體藥物偶聯物亦可藉由抗體修飾進行製備，以便引入親電子部分，該親電子部分可與連接體試劑或藥物上之親核取代基反應。經糖基化抗體之糖可(例如)用高碘酸鹽氧化試劑進行氧化，以形成醛基或酮基，其可與連接體試劑或藥物部分之胺基反應。所得亞胺希夫鹼基團可形

成一穩定的連接，或可(例如)經硼氫化物試劑還原以形成穩定的胺基鍵結。在一實施例中，在可與藥物上適宜基團發生反應的蛋白質中，經糖基化抗體之糖部分與半乳糖氧化酶或間-高碘酸鈉之反應可產生羰基(醛基及酮基)。在另一實施例中，包含N末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白質可與間-高碘酸鈉反應，結果產生替代第一胺基酸之醛(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; 美國專利第US 5362852號)。該醛可與一藥物部分或連接體親核基團反應。

同樣，藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：胺基、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、縮胺基硫脲、甲酸肼及芳基肼基團，其能夠與連接體部分及連接體試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵結，其中該等親電子基團包括：(i)活性酯類，例如NHS酯類、HOBt酯類、鹵代甲酸酯及醯鹵；(ii)烷基及苄基鹵化物，例如鹵代乙醯胺；(iii)醛類、酮類、羧基及馬來醯亞胺基。

或者，包含該抗體及細胞毒性劑之融合蛋白可(例如)藉由重組技術或肽合成而製備。DNA長度可包含該偶聯物之相互鄰接的或藉由一編碼一連接體多肽(其不會破壞該偶聯物之期望特性)之區域分開的兩部分之各自區域。

在另一實施例中，該抗體可偶聯至用於腫瘤預尋靶作用之"受體"(如抗生蛋白鏈菌素)，其中將該抗體-受體偶聯物投與患者，隨後使用清除劑自循環系統中去除未結合的偶聯物，並隨後投與與一細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)偶

聯的"配體"(例如抗生物素蛋白)。

醫藥調配物

包含本發明抗體之治療性調配物係藉由將具有期望純度之抗體與可選生理學上可接受的載劑、賦形劑或穩定劑混合(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第20版(2000))以水性溶液形式、低壓凍乾形式或其他經乾燥調配物形式製備及儲存。可接受的載劑、賦形劑或穩定劑以所用劑型或濃度對於接受者係無毒的，且包括：緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；保存劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紫氯銨、氯化苄乙氧銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間-甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸類，例如甘胺酸、麩胺醯胺、天門冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖類、二糖類及其他糖類，包括葡萄糖、甘露糖或糊精類；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子表面活性劑，例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文調配物亦可按需要含有一種以上用於所治療的特定適應症的活性化合物，較佳係彼等相互間不會產生不利影

響的具有補充活性的化合物。適宜情況為，這些分子以對欲達成目標有效的量以相結合的形式存在。

這些活性成份亦可裝入分別通過(例如)凝聚技術或通過界面聚合製備的微膠囊中，例如，羥甲基纖維素或明膠微膠囊和聚甲基丙烯酸甲酯微膠囊，這些活性成份位於膠質藥物輸送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微滴乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或粗滴乳液中。此等技術揭示於Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第20版(2000)。

用於活體內投與之調配物必須為無菌的。此可容易地藉由穿過無菌過濾膜進行過濾而達成。

亦可製備成緩釋製劑。緩釋製劑之適宜實例包括含有本發明免疫球蛋白之固態疏水聚合物之半透性基質，該等基質係呈成形物件形式，例如，膜或微膠囊。緩釋基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(甲基丙烯酸2-羥乙基酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ 乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物，例如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物與乙酸亮丙瑞林組成之可注射微球體)以及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。儘管例如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸等聚合物可使分子持續釋放超過100天，但某些水凝膠釋放蛋白質時間較短。當裝入膠囊之免疫球蛋白長時間停留在體內時，在37°C下暴露於潮濕環境中會使其變性或聚集，導致生物學活性損失及可能的

免疫原性改變。依據所涉及機制可設計出合理的策略以保持穩定性。舉例而言，若發現聚集機制係經由硫代二硫化物互換形成份子間S-S鍵，則穩定性可藉由修飾巰基殘基、自酸溶液凍乾、控制水分含量、使用適當的添加劑及形成特定聚合物基質組合物而達成。

用途

本發明抗體可(例如)在活體外、離體及活體內療法中使用。

本發明提供可用於調節與FGF19及/或FGFR4表現及/或活性有關之疾病狀態(例如增強的表現及/或活性或不期望的表現及/或活性)的方法及組合物，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。在一些實施例中，該疾病狀態與增強的FGF19表現有關，且該疾病狀態包括膽汁阻塞或膽汁酸代謝失調。

在一態樣中，本發明提供用於治療或預防腫瘤、癌症、及/或細胞增殖病症之方法，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。

在一態樣中，本發明提供治療或預防與增強的FGF19表現及/或活性有關之腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症之方法，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。

在一態樣中，本發明提供治療或預防與增強的FGFR4表現及/或活性有關之腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症之方法，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-

FGF19抗體。

在一態樣中，本發明提供用於治療及/或預防肝病症之方法，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。在一些實施例中，該肝病症係肝硬化。

在一態樣中，本發明提供用於治療及/或預防消耗性病症之方法，該等方法包括對需此治療之個體投與有效量之抗-FGF19抗體。在一些實施例中，該個體患有腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症。

應瞭解，在治療方法中可使用任何適宜的抗-FGF19抗體，包括單株及/或多株抗體、人類抗體、嵌合抗體、親和性成熟抗體、人類化抗體及/或抗體片段。在一些實施例中，本文所述任何抗-FGF19抗體皆係用於治療。

此外，至少有一些本發明抗體可結合來自其他物種之抗原。因此，本發明抗體可(例如)在一包含該抗原之細胞培養物中、在人類受試者中或在具有一本發明抗體可與其進行交叉反應之抗原的其他哺乳動物受試者(例如猩猩、狒狒、狨猴、獼猴及恒河猴、家豬或小鼠)中用於結合特異性抗原活動。在一實施例中，本發明抗體可用於抑制抗原活動，其藉由使該抗體與該抗原接觸從而抑制該抗原而達成。較佳地，該抗原係人類蛋白質分子。

在一實施例中，本發明抗體可在患有與增強的抗原表現及/或活性有關之病症之個體中用於與抗原結合之方法中，包括投與該受試者本發明抗體以便結合該受試者體內之抗原。較佳地，該抗原係人類蛋白質分子，且該受試者

係一受試人。或者，該受試者可係一表現本發明抗體可結合之抗原的哺乳動物。此外，該受試者可係一已經引入該抗原(例如藉由投與該抗原或藉由一抗原轉基因之表現)之哺乳動物。為達治療目的，可將本發明抗體投與受試人。此外，為醫獸類之目的或作為人類疾病之動物模型，可將本發明抗體投與一表現該免疫球蛋白可與其進行交叉反應之抗原的非人類哺乳動物(例如靈長類、家豬或小鼠)。關於後者，此類動物模型可用於評估本發明抗體之治療效果(例如用於測試投與劑量及時期)。

本發明抗體可用於治療、抑制或預防與一或多種抗原分子之表現及/或活性有關之疾病、病症或病況或延遲其增進、預防/延遲其復發。

在某些實施例中，將一包含與一或多種細胞毒素劑偶聯之抗體的免疫偶聯物投與患者。在一些實施例中，該免疫偶聯物及/或其所結合之抗原係由細胞攝入，在對其所結合的目標細胞進行殺滅中達成增強的免疫偶聯物治療功效。在一實施例中，該細胞毒性劑以該目標細胞中之核酸作為攻擊對象或對其進行干擾。在一實施例中，該細胞毒性劑以微管聚合作用為目標或對其進行干擾。該等細胞毒性劑之實例包括任何本文提及的化學治療劑(例如類美登素、奧雷司他汀、多拉司他汀或卡奇黴素)、放射活性同位素、或核糖核酸酶或DNA核酸內切酶。

在本文任何方法中，可隨本文抗體投與該受試者一有效量之第二醫藥(其中本文抗體係第一醫藥)，其係可在需治

療之受試者中治療病況之另一活性劑。舉例而言，本發明抗體可與另一抗體、化學治療劑(包括化學治療劑混合物)、抗血管生成劑、免疫抑制劑、細胞因子、細胞因子拮抗劑及/或生長抑制劑一同投與。此第二醫藥之類型應端視多種因素而定，該等因素包括病症類型(例如癌症或一自身免疫性疾病)、疾病嚴重度、患者之病況及年齡、所採用第一醫藥之類型及劑量等等。

舉例而言，當將本發明抗體用於抑制腫瘤生長時，尤佳將其與一或多種亦可抑制腫瘤生長之其他治療劑組合。舉例而言，在一治療方案中，例如在治療本文所述任一疾病(包括結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌)中，可將本發明抗體與抗血管生成劑(例如抗-VEGF抗體(例如 AVASTIN®)及/或抗-ErbB抗體(例如 HERCEPTIN® 曲司佐單抗抗-HER2抗體或可結合 HER2 之結構域 II 的抗-HER2抗體，例如 OMNITARG™ 帕妥珠單抗抗-HER2抗體)組合。或者或另外，該患者可接受綜合放射治療(例如外線束輻照或利用放射性標記作用物(例如抗體)之療法)。上面指出的此等組合療法包括組合施與(其中兩或更多種作用物包含在相同的或分開的調配物中)及分開施與(在此情況下，本發明抗體之投與可在施與輔助療法之前、及/或之後進行)。另外，本發明抗體與一相對非細胞毒性劑(例如另一生物學分子，如另一抗體)之組合同該抗體與對細胞具有高毒性之其他作用物化學治療劑之組合相比預計可降低細胞毒性。

利用本文抗體與一或多種第二醫藥之組合之治療較佳可達成癌症體徵或症狀之改善。舉例而言，此療法相對於僅用第二醫藥治療的患者(例如僅用化學治療劑)可達成存活率(總存活率及/或無惡化存活率)之進步、及/或可達成目標反應*(部分的或完全的，較佳係完全的)。此外，利用本文抗體與一或多種第二醫藥之組合之治療較佳可達成一累加的、且更佳係協同的(或大於累加的)對患者之治療益處。較佳地，在此組合方法中，介於至少一次之該第二醫藥投與與至少一次之該抗體投與之間的時限為約一個月或更小、更佳係約兩周或更小。

對於癌症治療，該第二醫藥較佳為另一抗體、化學治療劑(包括化學治療劑混合物)、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞因子、細胞因子拮抗劑、細胞毒性放射療法、腎上腺皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、鎮痛藥、抗血管劑及/或生長抑制劑。該細胞毒性劑包括與DNA相互作用之藥劑、抗代謝物、拓撲異構酶I或II抑制劑、或是紡錘體抑制劑或穩定劑(例如較佳長春花生物鹼，更佳選自長春花鹼、去氧長春減溫鹼、長春新鹼、長春地辛、長春瑞濱、長春匹定(vinepidine)、長春磷汀(vinfosiltine)、長春利定(vinzolidine)及長春福寧(vinfunine))、或任何在化學治療中所用藥劑(例如5-FU、紫杉烷、多柔比星或地塞米松(dexamethasone))。

在另一實施例中，該第二醫藥為用於治療癌症之另一抗體，例如定向抑制HER2/neu受體之細胞外結構域之彼等

(例如曲司佐單抗)或其功能片段之一、泛-HER抑制劑、Src抑制劑、MEK抑制劑、或EGFR抑制劑(例如抗-EGFR抗體(例如一抑制EGFR之酪胺酸激酶活性者)，其較佳為小鼠單株抗體225、其小鼠-人嵌合衍生物C225、或一自此抗體225衍生的人類化抗體或經衍生的天然作用物、二苯胺鄰苯二甲醯亞胺類、吡唑并或吡咯并吡啶并嘧啶、喹唑啉類、吉非替尼(gefitinib)、埃羅替尼、西土西單抗、ABX-EFG、坎奈替尼(canertinib)、EKB-569及PKI-166)、或雙-EGFR/HER-2抑制劑(例如拉帕替尼)。其他之第二醫藥包括阿來組單抗(CAMPATH™)、FavID(IDKLH)、具有經改變糖基化之CD20抗體(例如GA-101/GLYCART™)、奧利默森(oblimersen)(GENASENSE™)、沙立度胺(thalidomide)及其類似物，例如雷利度胺(lenalidomide)(REVLIMID™)、伊馬替尼、索拉非尼、ofatumumab(HUMAX-CD20™)、抗-CD40抗體(例如SGN-40)、及抗-CD-80抗體(例如galiximab)。

該止吐劑較佳為鹽酸昂丹司瓊(ondansetron hydrochloride)、鹽酸格拉司瓊(granisetron hydrochloride)、metoclopramide、多潘立酮(domperidone)、氟派啶醇派啶醇、賽克利嗪(cyclizine)、勞拉西泮(lorazepam)、丙氯拉嗪(prochlorperazine)、地塞米松、左旋甲丙嗪(levomepromazine)或托吡西隆(tropisetron)。疫苗較佳係以GM-CSF DNA及細胞為基礎的疫苗、樹突細胞疫苗、重組體病毒性疫苗、熱激蛋白

(HSP)疫苗、異體或自體腫瘤疫苗。鎮痛藥劑較佳係布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、三水楊酸膽鹼鎂、或鹽酸氧可酮。抗血管劑較佳係貝伐單抗或rhuMAb-VEGF。其他第二醫藥包括抗-增生劑，例如法呢基蛋白轉移酶抑制劑、抗-VEGF抑制劑、p53抑制劑或PDGFR抑制劑。本文第二醫藥亦包括生物學射靶療法(例如以抗體進行之治療)以及小分子射靶療法(例如抑制某些受體者)。

許多抗血管生成劑已經鑑別出來且為業內所瞭解，包括本文所列示之彼等，例如在定義中所列示者，及藉由(例如)以下文獻所列示者：Carmeliet及Jain，Nature 407:249-257 (2000)；Ferrara等人，Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004)；及Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)。亦參見美國專利申請案第US20030055006號。在一實施例中，用抗-FGF19抗體與一抗-VEGF中和抗體(或片段)及/或另一VEGF拮抗劑或一VEGF受體拮抗劑結合使用，其包括(但不限於)(例如)可溶性VEGF受體(例如VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、neuropillins(例如NRP1、NRP2))片段、能夠阻斷VEGF或VEGFR之適體類、中和抗-VEGFR抗體、VEGFR酪胺酸激酶(RTK)之低分子量抑制劑、VEGF之反義策略、對抗VEGF或VEGF受體之核酶、VEGF之拮抗劑變體；及其任何組合。或者或另外，除VEGF拮抗劑及其他藥劑之外，可視情況將兩或多種血管生成抑制劑共投與該患者。在某些實施例中，可與抗-FGF19抗體、VEGF拮抗劑、及一抗血管生成劑聯合投與

一或多種另外的治療劑(例如抗癌劑)。

本文可用化學治療劑於上文(例如在"化學治療劑"之定義中進行定義。

例示性第二醫藥包括：烷烷基化試劑、葉酸拮抗劑、嘧啶拮抗劑、細胞毒性抗生素、鉑化合物或基於鉑之化合物、紫杉烷、長春花生物鹼、c-Kit抑制劑、拓撲異構酶抑制劑、抗-血管生成抑制劑(例如抗-VEGF 抑制劑) HER-2抑制劑、EGFR抑制劑或雙EGFR/HER-2激酶抑制劑、抗雌激素(例如氟維司群)及激素療法藥劑(例如卡鉑、順鉑、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱、表柔比星、他莫昔芬、芳香化酶抑制劑及強的松)。最佳地，該癌症係結腸直腸癌且該第二醫藥為EGFR抑制劑(例如埃羅替尼)、抗-VEGF抑制劑(例如貝伐單抗)，或係西土西單抗、arinotecan、伊立替康立替康或FOLFOX，或該癌症係乳腺癌且該第二醫藥為抗雌激素調節劑(例如氟維司群、他莫昔芬或一芳香化酶抑制劑(例如來曲唑、依西美坦或阿納托司唑))，或係一VEGVEGF抑制劑(例如貝伐單抗)，或係一化學治療劑(例如多柔比星及/或一紫杉烷(例如紫杉醇))，或係一抗HER 2抗體抑制劑(例如曲司佐單抗)，或雙EGFR/HER-2激酶抑制劑(例如拉帕替尼)或一HER-2下調劑(例如17AAG(係一熱激蛋白[Hsp] 90毒物之格爾德徽素衍生物))(例如用於對曲司佐單抗已經發生惡化的乳腺癌)。在其他實施例中，該癌症係肺癌(例如小細胞肺癌)且該第二醫藥係一VEGF抑制劑(例如貝伐單抗)或一EGFR抑制劑(例

如埃羅替尼)或一c-Kit抑制劑(例如伊馬替尼)。在其他實施例中，該癌症係肝癌(例如肝細胞癌)且該第二醫藥為一EGFR抑制劑(例如埃羅替尼)、一化學治療劑(例如多柔比星或伊立替康)、一紫杉烷例如(紫杉醇)、沙立度胺及/或干擾素。此外，一用於前線治療癌症的較佳化學治療劑係紫杉德(taxotere)獨個兒或與其他第二醫藥之組合。最佳地，若施與化學治療，則應首先投與化學藥劑，隨後投與本文抗體。

此等第二醫藥可在投與本文抗體後48小時內投與或在該藥劑後24小時內、或在12小時內、或在3至12小時內投與，或可經一預先選定的時間段(較佳約1至2天)投與。此外，此藥劑之劑量可低於治療劑量。

本文抗體可同時投與、依序投與、或與該第二醫藥交替投與或在對其他療法無響應時投與。因此，第二醫藥之組合投與包括使用分開的調配物或單一醫藥調配物之共投與(同時投與)，及以任一順序連續投與，其中較佳存在一時間段，但兩種(或全部)醫藥同時發揮其生物學活性。所有該等第二醫藥皆可相互組合地或其獨自地隨第一醫藥使用，所以本文所用表述"第二醫藥"並非欲指其各自係除第一醫藥之外的唯一醫藥。因此，該第二醫藥不必係一種醫藥，而是可構成包含一種以上此藥物。

如本文所給出之該等第二醫藥通常以與第一醫藥相同的劑量並以與第一醫藥相同的投與途徑、或以約1至99%的第一醫藥劑量使用。若使用此等第二醫藥，則其較佳以低

於當不存在第一醫藥時之劑量使用，尤其在遲於使用第一醫藥之初始給藥之繼後給藥中，以便排除或減小由此引起的副作用。

本發明亦提供用於抑制或預防復發腫瘤生長或復發癌細胞生長之方法及組合物。復發腫瘤生長或復發癌細胞生長係用於闡述一種如下情況：其中患者正經歷或接受一或多種當前可用的但在臨床上不足以治療該等患者之療法(例如癌症療法，例如化學治療、放射療法、手術、激素療法及/或生物製劑療法/免疫療法、抗-VEGF抗體療法、尤其一對於特定癌症之標準治療方案)的治療或該等患者不能再自該療法獲得任何有益影響從而該等患者需要其他有效療法。如本文所用，該短語亦可指一"非敏感性/難治性"患者之情況，例如，其描述對治療有反應但會受到副反應損害、產生抗性、對治療無反應、不能對治療產生令人滿意之反應的患者。在多個實施例中，一癌症係其中癌症細胞數目還未顯著降低(或已經增加)、或腫瘤大小還未顯著降低(或已經增加)、或未能達成任何在大小或在癌症細胞數目上之降低之復發腫瘤生長或復發癌細胞生長。對於該等癌症細胞是否係復發腫瘤生長或復發癌細胞生長的測定可在活體內或活體外藉由業內已知任何用於分析對癌症細胞之治療有效性的方法實施，在此一上下文中使用行業公認的"復發"或"難治性"或"非敏感性"含義。對抗-VEGF治療之腫瘤耐藥性係復發腫瘤生長之實例。

本發明提供在一受試者中阻斷或減小復發腫瘤生長或復

發癌細胞生長之方法，其係藉由投與一或多種抗-FGF19抗體以在受試者中阻斷或減小復發腫瘤生長或復發癌細胞生長而實現。在某些實施例中，該拮抗劑可繼該癌症治療劑之後投與。在某些實施例中，該抗-FGF19抗體係與癌症療法同時施與。或者或另外，該抗-FGF19抗體療法與另一癌症療法交替施與，其可以任一次序實施。本發明亦涵蓋投與一或多種抑制性抗體以在先前易患癌症之患者中預防癌症之發病或復發之方法。一般而言，該受試者係同時接受癌症療法。在一實施例中，該癌症療法用一抗血管生成劑(例如 VEGF拮抗劑)進行治療。該抗血管生成劑包括業內已知之彼等及本文於定義中給出之彼等。在一實施例中，該抗血管生成劑為抗-VEGF中和抗體或片段(例如人類化 A4.6.1， AVASTIN®(Genentech, South San Francisco, CA)、Y0317、M4、G6、B20、2C3等等)。參見(例如)美國專利第 6,582,959 號、第 6,884,879 號、第 6,703,020；WO 98/45332；WO 96/30046；WO 94/10202；歐洲專利第 EP 0666868B1 號；美國專利申請案第 20030206899 號、第 20030190317 號、第 20030203409 號及第 20050112126 號；Popkov 等人，Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)；及 WO 2005012359。與 VEGF拮抗劑及一抗-FGF19抗體相組合可投與另外的藥劑以阻斷或減小復發腫瘤生長或復發癌細胞生長。

本發明抗體(及輔助治療藥劑)係藉由任何適宜方式投與，包括：非經腸的、皮下注射、腹膜腔內的、肺內的、

及鼻內的以及(若期望用於局部治療)病變內的投與。非經腸的輸注包括：肌內的、靜脈內的、動脈內的、腹膜腔內的或皮下注射的投與。另外，該等抗體可適當地藉由靜脈輸注(尤其以該抗體之漸小劑量)投與。可藉由任一適宜途徑給藥，例如藉由注射，如靜脈內或皮下注射，部分係端視該投與時間長短而定。

本發明抗體組合物之調配、定量、及投與應以一符合良好醫療實踐之形式施行。在此情況下應考慮因素包括：擬治療之特定病症、擬治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病況、病症起因、藥劑遞送位點、投藥方法、投藥時間安排及醫療從業者已知之其他因素。該抗體不必(但可視情況)用一或多種當前用於預防或治療所討論病症之藥劑進行調配。此等其他藥劑之有效量端視該調配物中所包含的本發明抗體之量、病症或治療之類型及上文所討論之其他因素而定。該等通常以與前文所用相同之劑量及使用與前文所用相同之投與途徑或以約1%至99%之前文所採用劑量進行施用。

對於預防或治療疾病，本發明抗體之適宜劑量(當單獨使用或與其他藥劑組合使用時)應端視擬治療疾病之類型、抗體類型、疾病之嚴重度及病程、該抗體之投與係用於預防目的還是治療目的、先前療法、患者之臨床病史及對該抗體之響應及主治醫師之考慮而定。該抗體係一次性地或經一系列治療投與患者。端視該病症之類型及嚴重度，約1微克/公斤至15毫克/公斤(例如0.1毫克/公斤至10毫

克/公斤)抗體係投與該患者之初始候選劑量，無論(例如)藉由一或多次分開投與或藉由連續輸注投與。一典型每日劑量可係自約1微克/公斤至100毫克/公斤或更大，端視上文所提及因素而定。對於經若天或更長時間之重複投藥，端視病況而定，該治療係持續至期望的對疾病症狀之抑制出現為止。該抗體之一例示性劑量應處於自約0.05毫克/公斤至約10毫克/公斤之範圍內。因此，可對該患者投與一或多次約0.5毫克/公斤、2.0毫克/公斤、4.0毫克/公斤或10毫克/公斤(或其任一組合)之劑量。此等劑量可間歇性地投與，例如每週或每三周投與(例如，如此以使該患者可接受自約兩次至約二十次(例如約六次)劑量之該抗體)。可先投與一較高負荷劑量，再投與一或更多個較低劑量。一例示性給藥方案包括：投與約4毫克/公斤之起始負荷劑量，隨後每週投與約2毫克/公斤之該抗體的維持劑量。然而，亦可使用其他劑量方案。此治療之進展可容易地由慣用技術及測試法進行監測。

本發明抗-FGF19抗體可用於在具體細胞或組織中檢測FGF19表現之測試(例如診斷性分析或預測性分析)中，其中該等抗體係按下文所述經標記及/或固定於一可溶基質上。然而，應瞭解，在涉及檢測及診斷之實施例中可使用任一適合的抗-FGF19抗體。一些製造抗-FGF19抗體之方法於本文中進行闡述且製造抗-FGF19抗體之方法為業內人士所熟知。

在另一態樣中，本發明提供檢測FGF19之方法，該等方

法包括檢測該樣品中的FGF19-抗-FGF19抗體複合體。本文所用術語"檢測"包括定性及/或定量檢測(量測水平)，參照或不參照對照物。

在另一態樣中，本發明提供用於診斷與FGF19表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自患有或懷疑患有該病症之個體的生物試樣中檢測FGF19-抗-FGF19抗體複合體。在一些實施例中，該FGF19表現係增強的表現或異常的(不期望的)表現。

在另一態樣中，本發明提供任何本文所述抗-FGF19抗體，其中該抗-FGF19抗體含有可探測的標記物。

在另一態樣中，本發明提供一任一本文所述抗-FGF19抗體與FGF19之複合物。在某些實施例中，該複合物係活體內的或活體外的。在一些實施例中，該複合體含有一癌細胞。在某些實施例中，以可檢測方式對該抗-FGF19抗體進行標記。

在許多業內熟知檢測分析方法之任一方法中，可用抗-FGF19抗體(例如任何本文所述FGF19抗體)來檢測FGF19。

在一態樣中，本發明提供用於檢測與FGF19表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自個體之生物試樣中檢測FGF19。在某些實施例中，該FGF19表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，該病症係腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。在某些實施例，該生物試樣係血清或腫瘤試樣。

在另一態樣中，本發明提供為個體選擇治療之方法，該等方法包括：(a) 對個體生物試樣中 FGF19 表現進行檢測，若存在；及 (b) 在步驟 (a) 完成後，為該個體選擇治療，其中治療選擇係基於在步驟 (a) 中檢測到的 FGF19 表現。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的 FGF19 表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的 FGF19 表現進行檢測。在某些實施例中，對 FGF19 表現進行檢測，並選擇利用抗-FGF19 抗體之治療。本文闡述用抗-FGF19 抗體治療病症之方法且本文對一些方法進行例示。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之抗-FGF19 抗體(並且其中在投與抗-FGF19 抗體之前、期間、或之後在取自該人類患者之細胞及/或組織中對 GF19 表現及/或 FGFR4 進行檢測)治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤、及/或細胞增殖病症或肝病症(例如肝硬化)之個體的方法。在某些實施例中，在投與抗-FGF19 抗體之前、期間及/或之後對 FGF19 過表現進行檢測。在某些實施例中，在投與抗-FGF19 抗體之前、期間及/或之後對 FGFR4 表現進行檢測。可在投與抗-FGF19 抗體之前；期間；之後；在之後前及期間；之前及之後；期間及之後；或之前、期間及之後對表現進行檢測。本文闡述用抗-FGF19 抗體治療病症之方法且本文對一些方法進行例示。

舉例而言，藉由下述操作關於 FGF19 對生物試樣進行分

析：自一期望來源獲得試樣，將該試樣與抗-FGF19抗體混合以使該抗體與混合物中所存在的任一FGF19形成抗體/FGF19複合體，及檢測該混合物中所存在的所有抗體/FGF19複合體。生物試樣可藉由適合於該特定試樣之業內已知方法進行製備用於分析。該等將樣品與抗體混合之方法及檢測抗體/FGF19複合體之方法係根據所用測試類型進行選擇。此等測試包括免疫組織化學測試、競爭性及夾心測試、及立體化學抑制測試。對於樣品製備，可使用一取自哺乳動物(通常係人類患者)之組織或細胞試樣。試樣實例包括(但不限於)：癌症細胞，例如結腸、乳房、前列腺、卵巢、肺、胃、胰腺、淋巴瘤及白血病癌症細胞。亦可在血清中對FGF19進行量測。該試樣可藉由多種業內已知程序獲得，該等程序包括(但不限於)：外科切除術、抽吸術或活體組織檢查。組織可係新鮮的或冰凍的。在一實施例中，將樣品固定及包埋在石蠟或類似物中。可藉由慣用操作法對組織試樣進行固定(即保存)(參見(例如)"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology,"第3版(1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) 編輯，The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York；The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel，編輯，Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.)。一業內普通技術人員應瞭解，固定劑

之選擇係藉由擬對該試樣進行組織學染色或另外實施分析之目的而確定。一業內普通技術人員亦應瞭解，固定時長亦應端視組織試樣大小及所用固定劑而定。舉例而言，可用中性緩衝的福爾馬林、包音氏液(Bouin's)或低聚甲醛來固定樣品。一般而言，首先對樣品進行固定並隨後經遞升系列之醇類實施脫水，用石蠟及其他切片介質實施浸潤及包埋，以便可對該組織試樣實施切割。或者，可切割該組織並固定所得切片。舉例而言，可藉由慣用操作法對該組織試樣實施石蠟包埋及處理(參見(例如)"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"，上文)。可用石蠟之實例包括(但不限於)：Paraplast、Broloid及Tissuemay。當對該組織試樣實施包埋後，藉由顯微切片機或類型儀器對該試樣實施切割(參見(例如)"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"，上文)。舉例而言，對於此程序，切片可係自約3微米至約5微米厚。切割後，可藉由若干標準方法將該等切片貼至載玻片上。載玻片黏著劑之實例包括(但不限於)：矽烷、明膠、聚-L-賴胺酸及諸如此類。舉例而言，可將石蠟包埋切片貼至帶正電荷的載玻片及/或用聚-L-賴胺酸混合物覆的載玻片上。若已用石蠟作為包埋劑，則一般對該等組織切片實施去石蠟化及用水實施再水化。該等組織切片可藉由若干慣用標準操作法實施去石蠟化。舉例而言，例如使用二甲苯類及一逐步遞送系列之醇類(參見(例如)"Manual of Histological

Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"，上文)。或者，可使用可購得之去石蠟化非有機藥劑(例如Hemo-De7(CMS, Houston, Texas))。

針對FGF19之分析法皆使用一或多種以下試劑：經標記的FGF19類似物、經固定的FGF19類似物、經標記的抗-FGF19抗體、經固定的抗-FGF19抗體及立體化學偶聯物。經標記的試劑亦稱為"示蹤物"。

所用標記物係不會干擾FGF19及抗-FGF19抗體之結合的任何可探測功能團。已知有多種標記物可用於免疫測定法中，實例包括可直接檢測到的部分(例如螢光染料、化學發光的標記物、及放射性的標記物)以及必須經反應或經衍生才能被檢測到的部分(例如酵素)。

所用標記物係不會干擾FGF19及抗-FGF19抗體之結合的任何可探測官能團。已知有多種標記物可用於免疫測定法中，實例包括可直接檢測到的部分(例如螢光染料、化學發光的標記物及放射性的標記物)以及必須經反應或經衍生才能被檢測到的部分(例如酵素)。該等標記物之實例包括：放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I 、螢光團(例如稀土螯合物或螢光素及其衍生物)、羅丹明(rhodamine)及其衍生物、丹醯(dansyl)、傘形酮(umbelliferone)、螢光素酶(例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號))、螢光素、2,3-二氫酞嗪二酮類、辣根過氧化物酶(HRP)、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化

酶、及6-磷酸葡萄糖脫氫酶)、雜環氧化酶類(例如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與可利用過氧化氫來氧化染料前體(例如HRP)之酵素偶合；乳過氧化物酶；或微過氧化物酶)、生物素/抗生物素蛋白、自旋標記物、噬菌體標記物、穩定的自由基及諸如此類。

可利用慣用方法使該等標記物共價地與蛋白質或多肽結合。舉例而言，可使用偶聯劑(例如二醛類、碳二亞胺類、二馬來鹽亞胺類、雙鹽亞胺化物、雙偶氮聯苯胺及諸如此類)來標記該等具有上述螢光標記物、化學發光標記物、及酵素標記物之抗體。參見(例如)美國專利第3,940,475號(螢光測定法)及第3,645,090號(酵素)；Hunter等人，*Nature*, 144: 945 (1962)；David等人，*Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974)；Pain等人，*J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981)；及Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)。本文較佳標記物係酵素，例如辣根過氧化物酶及鹼性磷酸酶。此類標記物(包括該等酵素)之偶聯對於免疫測定技術領域中之普通技術人員而言係標準操作程序。參見(例如)O'Sullivan等人，"Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay,"於*Methods in Enzymology*(編輯J.J. Langone及H. Van Vunakis，第73卷(Academic Press, New York, New York, 1981)，第147至166頁)中。

對於某些分析方法需要試劑固定。固定需要將抗-FGF19

抗體自在溶液中保持游離的任何FGF19中分離出來。此按照慣例係藉由使抗-FGF19抗體或FGF19類似物在該測試程序之前不溶(如藉由吸附至水不溶性基質或表面(Bennich等人, 美國專利第3,720,760號)、藉由共價偶聯(例如使用戊二醛交聯))或藉由使抗-FGF19抗體或FGF19類似物在該測試程序之後不溶(例如藉由免疫沉澱作用)。

蛋白質在一試樣中之表現可使用免疫組織化學及染色方案進行檢定。已顯示, 免疫組織化學染色法係一評估或檢測蛋白質在一試樣中之存在度的可靠方法。免疫組織化學("IHC")技術通常藉由生色法或螢光法利用抗體來探測並原位顯現細胞抗原。對於樣品製備, 可使用一取自哺乳動物(通常係人類患者)之組織或細胞試樣。該試樣可藉由多種業內已知程序獲得, 該等程序包括(但不限於): 外科切除術、抽吸術或活體組織檢查。組織可係新鮮的或冰凍的。在一實施例中, 將樣品固定及包埋在石蠟或類似物中。可藉由慣用操作法對組織試樣進行固定(即保存)。一業內普通技術人員應瞭解, 固定劑之選擇係藉由擬對該試樣進行組織學染色或另外實施分析之目的而確定。一業內普通技術人員亦應瞭解, 固定時長亦應端視組織試樣大小及所用固定劑而定。

IHC可與其他技術(例如形態學染色及/或螢光原位雜交)聯合實施。可採用兩種通常IHC方法; 直接測試及間接測試。根據第一種測試, 直接測定抗體與靶抗原(例如FGF19)之結合。此直接測試使用經標記試劑(例如螢光標

籤或經酵素標記的初級抗體)，其可直接顯現而無需其他抗體相互作用。在一典型的間接測試中，使未結合的初級抗體與抗原結合，並隨後使一經標記二級抗體與該初級抗體結合。當該二級抗體與一酵素標記物偶聯後，添加一生色底物或螢光底物以使該抗原顯現出來。因若干二級抗體可與該初級抗體上之不同抗原決定部發生反應，可出現信號放大現象。

用於免疫組織化學之初級及/或二級抗體通常應用一可檢測部分加以標記。可使用多種標記物，其通常可劃分成以下類別：

除上文所討論之試樣製備程序外，可能需要在IHC之前、期間或之後對該組織切片做進一步處理，舉例而言，可實施抗原決定部位修復法(例如在檸檬酸鹽緩衝劑中加熱該組織試樣)(參見(例如) Leong 等人 Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996))。

經一可選阻斷步驟後，經一充足時段並在適宜條件下使該組織切片與初級抗體接觸，以使該初級抗體與該組織試樣中之目標蛋白抗原結合。達成此目的之適宜條件可藉由常規實驗進行確定。抗體與該試樣結合之程度係藉由使用上文所討論可檢測標記物之任一種進行測定。較佳地，該標記物為可催化該發色底物(例如3,3'-二胺基聯苯發色染劑)之化學變化的酵素標記物(例如HRPO)。較佳地，該酵素標記物係與可特異性地結合該初級抗體之抗體(例如該初級抗體係兔多株抗體及二級抗體係山羊抗兔抗體)相偶

聯。

可將如此製備的樣品固定好並蓋上蓋玻片。隨後，(例如)使用顯微鏡確定載玻片估定值，且可採用業內常規使用的染色密度標準。

其他測定方法(稱為競爭測試法或夾心測試法)早已確立並在商業診斷行業中廣泛使用。

競爭性測試法依賴一示蹤劑FGF19類似物與測試試樣FGF19競爭有限數目的抗-FGF19抗體抗原結合位點之能力。抗-FGF19抗體通常在該競爭之前或之後係不溶的，及隨後與抗-FGF19抗體結合的示蹤劑及FGF19自非結合的示蹤劑及FGF19中分離出來。此分離過程係藉由傾析法(其中結合配偶體係預先不溶解的)或藉由離心法(其中結合配偶體係在該競爭性反應之後沉澱)實現。測試試樣FGF19之數量與已結合示蹤劑之數量(如藉助標記底物之數量進行估量)成反比。準備已知數量之FGF19的劑量反應曲線，並與測試結果進行比較以定量地測定該測試試樣中存在的FGF19之數量。當用酵素作為可檢測標記物時，該等測試法稱為ELISA系統。

另一類競爭性測試法(稱為"均質"測試法)無需相分離過程。此處，製備並使用一酵素與FGF19之偶聯物，如此當抗-FGF19抗體與FGF19結合時，抗-FGF19抗體之存在可改變該酵素活性。在此情況下，FGF19或其免疫學活性片段係用雙功能有機橋與酵素(例如過氧化物酶)偶聯。對偶聯物進行選擇用於隨抗-FGF19抗體使用以便抗-FGF19抗體

之結合可抑制或加強該標記物之酵素活性。此方法以 EMIT 之名廣泛用於實踐中。

在用於均質測試之空間位阻方法中使用立體化學偶聯物。該等偶聯物係藉由連接一低分子量半抗原與一小 FGF19 片段而製備，如此半抗原之抗體實質上不能與抗-FGF19 抗體同時結合該偶聯物。在此測試程序中，在測試試樣中存在的 FGF19 應結合抗-FGF19 抗體，藉此使抗-半抗原結合該偶聯物，致使該偶聯物半抗原之一特徵變化，例如當該半抗原為螢光團時係螢光性變化。

夾心測試尤其可用於測定 FGF19 或抗-FGF19 抗體。在依序夾心測試中，用一經固定的抗-FGF19 抗體吸附測試試樣 FGF19，(如)藉由洗滌去除該測試試樣，用結合的 FGF19 吸附二級經標記抗-FGF19 抗體，並隨後自剩餘示蹤劑分離出已結合物。已結合示蹤劑之數量與測試試樣 FGF19 成正比。在"同時"夾心測試法中，在添加該經標記抗-FGF19 之前不分離該測試試樣。使用一抗-FGF19 單株抗體作為一抗體並使用一多株抗-FGF19 抗體作為另一抗體之依序夾心測試法可用於測試 FGF19 試樣。

上述僅係例示性的 FGF19 檢測測試法。本發明涵蓋當前或以後研發的其他使用抗-FGF19 抗體來測定 FGF19 之方法，包括本文所述活體檢定法。

在一態樣中，本發明提供在取自個體(例如人類受試者)之生物學試樣中檢測(例如存在或不存在或數量)多核苷酸(例如 FGF19 多核苷酸)之方法。可採用檢測多核苷酸之多

種方法，且該等方法包括(例如)：RT-PCR、taqman法、擴增法、多核苷酸微陣列法及諸如此類。

用於檢測多核苷酸(例如 mRNA)之方法為業內人士所熟知，且包括(例如)：使用互補DNA探針之雜交測試法(例如使用經標記 FGF19 RNA探針之原位雜交)、北方印跡法及相關技術、及多種核酸擴增測試法(例如使用對 FGF19 具特异性之互補引物的 RT-PCR 及其他擴增型檢測方法，例如分支 DNA、SPIA、Ribo-SPIA、SISBA、TMA 及諸如此類)。

使用北方斑點印跡法或 PCR 分析法可方便地關於(例如) FGF19 mRNA 對取自哺乳動物之生物學試樣進行測試。舉例而言，諸如定量 PCR 測試法之 RT-PCR 測試法為業內所熟知。在本發明之說明性實施例中，在生物試樣中檢測 FGF19 mRNA 之方法包括：使用至少一引物藉由逆轉錄作用自該試樣產生 cDNA；使用一 FGF19 多核苷酸作為有意及反義引物對如此製備的 cDNA 實施擴增以便擴增其中的 FGF19 cDNAs；及檢測經擴增 FGF19 cDNA 之存在或缺失。另外，此等方法可包括能夠在一生物試樣中測定 FGF19 mRNA 之數量(含量)的一或多個步驟(例如藉由同時檢測一持家基因(例如一肌動蛋白家族成員)之比較對照 mRNA 序列之含量)。視情況，可測定經擴增 FGF19 cDNA 之序列。

探針及/或引物可用一可檢測標記(例如放射性同位素、螢光化合物、生物發光化合物、化學發光化合物、金屬螯

合劑或酵素)進行標記。此等探針及引物可用於檢測一試樣中FGF19多核苷酸之存在度，及作為一檢測表現FGF19蛋白質之細胞的方法。如業內熟練的技術工人應瞭解，可製備(例如基於本文中所提供之序列)大量不同引物及探針並將其有效地用於擴增、選殖及/或測定FGF19 mRNA之存在或不存在及/或數量。

可選本發明方法包括使用微陣列技術在一組織或細胞樣品檢測多核苷酸(例如FGF19多核苷酸)之方案。舉例而言，使用核酸微陣列，對取自測試及對照組織試樣之測試及對照mRNA試樣實施反轉錄及標記以生成cDNA探針。然後使該等探針與固定於固體載體上之核酸陣列雜交。對該陣列進行配置，以使該陣列各成員之序列及位置係已知的。舉例而言，可將有可能在某些疾病狀態中表現之基因的選擇集排列在固體載體上。一經標記探針與一特定陣列成員之雜交表明生成該探針之試樣可表現該基因。該病症組織之差別基因表現分析可提供有價值的信息。微陣列技術利用核酸雜交技術及計算技術來評估一單個實驗中成千上萬基因之mRNA表現特徵。(參見(例如)2001年10月11日公開的WO 01/75166；(關於陣列製造的討論參見(例如)美國專利第5,700,637號、美國專利第5,445,934號及美國專利第5,807,522號，Lockart, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680 (1996)；Cheung, V.G. 等人，*Nature Genetics* 21(增刊):15-19 (1999))。DNA微陣列係包含直接合成於或點斑點於玻璃或其他基質上之基因片段的小型陣列。通常在單

陣列中表現成千上萬的基因。典型微陣列實驗包括以下步驟：1.用自試樣分離出來的RNA製備經螢光標記的靶標，2.使該經標記的靶標與微陣列雜交，3.洗滌、染色及掃描該陣列，4.分析掃描得到的圖像，及5.生成基因表現圖。當前使用兩種主要類型的DNA微陣列：寡核苷酸(通常25至70個基體)陣列及基因表現陣列(包含自cDNA製備的PCR產物)。在一陣列之形成中，寡核苷酸可預先製造並點至該表面上或就地直接合成至該表面上。

Affymetrix GeneChip®系統係一可購得微陣列系統，其包含藉由在一玻璃表面上直接合成寡核苷酸而製造的陣列。探針/基因芯片：藉由組合的基於半導體之微影蝕刻法及固相化學合成技術，將寡核苷酸(通常25個基體)直接合成於玻璃晶圓上。各芯片包含多達400,000個不同寡核苷酸且各寡核苷酸以數百萬之量存在。由於寡核苷酸探針係在該芯片上已知位置合成，藉由Affymetrix Microarray Suite軟體可從基因識別及相對表現水平之角度對雜交圖案及信號密度進行解釋。各基因藉助一系列不同的寡核苷酸探針顯示於該芯片上。各探針對由一完全匹配的寡核苷酸及一不匹配的寡核苷酸構成。該完全匹配的探針具有一與特定基因準確互補的序列且因此可量測該基因之表現。該不匹配探針與該完全匹配探針之不同在於：其在中央鹼基位置處具有一單鹼基取代，可干擾靶基因轉錄之結合。此有助於測定本底及可影響所量測信號的非特異性雜交從而得到完全匹配的寡核苷酸。此Microarray Suite軟體可自完

全匹配探針之雜交密度值中減去不匹配探針之雜交密度值以測定各探針組之絕對的或比率的密度值。探針係基於當前來自 GenBank 及其他核苷酸儲存處的信息而進行選擇。據認為，該等序列可識別該基因之單一的 3' 末端區域。用一 GeneChip Hybridization Oven ("電熱輪轉烘烤器" 烘箱) 來實施多達一次 64 個芯片之雜交。洗滌站 (fluidics station) 可對該等探針芯片實施洗滌及染色。其係完全自動化的且包含四個模組，每個模組包含一個探針陣列。藉助 Microarray Suite 軟體使用預編程的射流方案對各模組進行控制。掃描器係一共聚焦激光螢光掃描器，其可量測與該等探針陣列結合的經標記 cRNA 所發出的螢光強度。隨 Microarray Suite 軟體使用的電腦工作站可控制該射流站及該掃描器。使用針對該探針陣列之預編程的雜交、洗滌及染色方案，Microarray Suite 軟體可控制多達 8 個射流站。該軟體亦可獲得雜交強度數據並利用適宜演算法將其轉化成各基因之存在/不存在值。最終，該軟體可藉由比較分析檢測介於多個實驗之間的基因表現變化，並可將輸出信息編排成 .txt 文件，該等 .txt 文件可隨其他軟體程式用於進一步數據分析。

在一些實施例中，對 FGF19 基因缺失、基因突變或基因擴增進行檢測。基因缺失、基因突變或擴增可藉由業內已知多種方案中之任一種進行量測，舉例而言，藉由慣用南方 (Southern) 印跡法、北方 (Northern) 印跡法 (以定量 mRNA 轉錄) (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201

5205 (1980))、斑點印跡法(DNA分析)、或原位雜交法(例如FISH)(使用經適當標記的探針)、細胞遺傳學方法或使用一經適當標記探針的比較基因組雜交(CGH)。另外，可採用該等方法來檢測FGF19配體基因缺失、配體突變、或基因擴增。如本文所用，"檢測FGF19表現"涵蓋檢測FGF19基因缺失、基因突變或基因擴增。

另外，可在一組織或細胞試樣中檢測FGF19基因之甲基化狀態。基因5'調節區中CpG島之異常的脫甲基化及/或超甲基化在永生的及經轉化的細胞中頻繁地發生，且可導致多種基因之改變的表現。用於檢測基因甲基化狀態之多種測試為業內人士所熟知。舉例而言，可以南方(Southern)雜交方法利用不能分開包含經甲基化CpG位點之序列的甲基化敏感性限制性內切酶來評估CpG島的甲基化狀態。另外，MSP(甲基化特異性PCR)可快速描繪出在一給定基因之CpG島中存在的所有CpG位點的甲基化狀態。此過程包括藉助亞硫酸氫鈉對DNA實施初始修飾(其會將所有未甲基化的胞嘧啶轉化成尿嘧啶)及隨後使用與未甲基化DNA相比較對甲基化DNA具有特異性之引物實施擴增。包括甲基化干擾之方案亦可參見(例如)：Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel等人編輯，1995；De Marzo等人，Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)；Brooks等人，Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536)；及Lethe 等人，Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)。如本文所用，"檢測FGF19表現"涵

蓋對FGF19基因甲基化進行檢測。

本發明申請案之實例揭示：FGFR4係在人類初級肝、肺及結腸腫瘤及結腸癌細胞系中進行表現，且另外FGF19及FGFR4係在人類初級肝、肺及結腸腫瘤及結腸癌細胞系中共表現。因此，於一些實施例中，在生物試樣中對FGFR4多肽及/或多核苷酸之表現進行檢測(單獨地或與FGF19表現聯合地(同時地及/或依序地)。如上文及業內所述，當前認為FGF19可與FGFR4受體結合。使用業內已知方法(包括本文所述彼等)，可對FGFR4之多核苷酸及/或多肽表現進行檢測。舉例而言，可採用上文所述IHC技術來檢測一或多種此分子於該試樣中之存在度。如本文所用，"聯合"欲涵蓋所有同時及/或依序檢測。因此，據認為，在其中不僅關於FGF19之存在度而且關於FGFR4之存在度對生物試樣進行檢驗之實施例中，可自同一組織或試樣製備分開的載玻片，並分別用一可結合FGF19及/或FGFR4之試劑來檢測各載玻片。或者，可自該組織或細胞試樣製備單個載玻片，並可與多色染色方案相聯合地使用針對FGF19及FGFR4之抗體以實現FGF19及FGFR4之顯跡及檢測。

在另一態樣中，本發明提供診斷與FGFR4表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自個體之生物試樣中檢測FGFR4。在某些實施例中，FGFR4表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，該病症係腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。在某些實施例，該生物試樣

係血清或腫瘤試樣。

在另一態樣中，本發明提供診斷與FGFR4及FGF19表現及/或活性有關之病症的方法，該等方法包括在取自個體之生物試樣中檢測FGFR4及FGF19。在某些實施例中，該FGF19表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，FGFR4表現係增強的表現或異常的表現。在某些實施例中，該病症係腫瘤、癌症、及/或細胞增殖病症，例如結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。在某些實施例，該生物試樣係血清或腫瘤試樣。在某些實施例中，FGFR4表現係在第一生物試樣中進行檢測，且FGF19表現係在第二生物試樣中進行檢測。

在另一態樣中，本發明提供為個體選擇治療之方法，該等方法包括：(a)對個體生物試樣中FGFR4表現進行檢測，若存在；及(b)在步驟(a)完成後，為該個體選擇治療，其中治療選擇係基於在步驟(a)中檢測到的FGFR4表現。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，對FGFR4表現進行檢測，並選擇利用抗-FGF19抗體之治療。

在另一態樣中，本發明提供為個體選擇治療之方法，該等方法包括：(a)對生物試樣中FGF19及FGFR4表現進行檢測，若存在；及(b)步驟(a)完成後，為該個體選擇治療，其中該治療選擇係基於步驟(a)中測得的FGF19及FGFR4表

現。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGF19表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGF19表現進行檢測。在某些實施例中，對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中增強的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，在個體中對相對於參考值或對照試樣之個體生物試樣中減小的FGFR4表現進行檢測。在某些實施例中，對FGFR4及FGF19表現進行檢測，並選擇利用抗-FGF19抗體之治療。在某些實施例中，FGFR4表現係在第一生物試樣中進行檢測，且FGF19表現係在第二生物試樣中進行檢測。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之抗-FGF19抗體(並且其中在投與抗-FGF19抗體之前、期間、或之後在取自該人類患者之細胞及/或組織中對GF19表現及/或FGFR4進行檢測)治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症或肝病(例如肝硬化)之個體的方法。在某些實施例中，在投與抗-FGF19抗體之前、期間及/或之後對FGF19過表現進行檢測。在某些實施例中，在投與抗-FGF19抗體之前、期間及/或之後對FGFR4表現進行檢測。可在投與抗-FGF19抗體之前；期間；之後；在之前及期間；之前及之後；期間及之後；或之前、期間及之後對表現進行檢測。

在一些涉及檢測之實施例中，除FGFR4檢測外或替代FGFR4檢測，對FGFR4下游分子信令之表現進行檢測。在

某些實施例中，對FGFR4下游分子信令之檢測包括對MAPK、FRS2或ERK2磷酸化的一或多個檢測。

某些涉及檢測之實施例進一步包括對Wnt途徑激活進行檢測。在某些實施例中，對Wnt途徑激活進行檢測包括 β -連環蛋白酪胺酸磷酸化、Wnt目標基因之表現、 β -連環蛋白突變及E-鈣黏蛋白與 β -連環蛋白之結合之一或多種。Wnt途徑激活之檢測為業內所瞭解，且本文對一些實例進行了闡述及例示。

在某些實施例中，該治療係針對一選自由下列組成之群的癌症：結腸直腸癌、肺癌、卵巢癌、垂體癌、胰腺癌、乳腺纖維腺瘤、前列腺癌、頭頸鱗狀細胞癌、軟組織肉瘤、乳腺癌、成神經細胞瘤、黑素瘤、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)、上皮癌、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌及肝細胞癌。

本文(例如)於生物試樣之定義中對生物試樣進行闡述。在某些實施例，該生物試樣係血清或腫瘤試樣。

在涉及檢測FGF19及/或FGFR4表現之實施例中，可對FGF19及/或FGFR4多核苷酸表現及/或FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。在某些涉及檢測FGF19及/或FGFR4表現之實施例中，對FGF19及/或FGFR4 mRNA表現進行檢測。在其他實施例中，利用抗-FGF19藥劑及/或抗-FGFR4藥劑對FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。在某些實施例中，利用抗體對FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。任一適合的抗體皆可用於檢測及/或診斷，包括單株及/或

多株抗體、人類抗體、嵌合抗體、親和性成熟抗體、人類化抗體及/或抗體片段。在某些實施例中，本文所述抗-FGF19抗體係用於檢測。在某些實施例中，利用免疫組織化學(IHC)對FGF19及/或FGFR4多肽表現進行檢測。在一些實施例中，使用IHC分析，FGF19表現得到2或更大之評分。

在某些涉及檢測FGF19及/或FGFR4表現之實施例中，可對GF19及/或FGFR4表現之存在及/或缺失及/或水平進行檢測。FGF19及/或FGFR4表現可係增強的。應瞭解，FGF19及/或FGFR4表現之缺失包括可忽略的或微量的水平。在某些實施例中，測試生物試樣中FGF19表現較在對照生物試樣中觀察到的結果(或對照或參考之表現水平)更高。在某些實施例中，測試生物試樣中FGF19表現較對照生物試樣中高至少約2-倍、5-倍、10-倍、20-倍、30-倍、40-倍、50-倍、75-倍、100-倍、150-倍或更高。在一些實施例中，用免疫組織化學("IHC")法對FGF19多肽表現進行測定，對於染色密度得分至少為2或更大。在一些實施例中，用IHC分析法對FGF19多肽表現進行測定，對於染色密度得分至少為1或更大、或至少為3或更大。在某些實施例中，測試生物試樣中FGF19表現低於在對照生物試樣中所觀察到的結果(或對照表現水平)。

在一些實施例中，FGF19表現係在血清中進行檢測而FGFR4表現係在腫瘤試樣中進行檢測。在一些實施例中，FGF19表現及FGFR4表現皆係在腫瘤試樣中進行檢測。在

一些實施例中，FGF19表現係在血清或腫瘤試樣中進行檢測，而FGFR4下游分子信令及/或FGFR4表現係在腫瘤試樣中進行檢測。在一些實施例中，FGF19表現係在血清或腫瘤試樣中進行檢測，而Wnt途徑激活係在腫瘤試樣中進行檢測。在一些實施例中，FGF19表現係在血清或腫瘤試樣中進行檢測，而FGFR4下游分子信令及/或FGFR4表現及/或Wnt途徑激活係在腫瘤試樣中進行檢測。

製造物件

在另一態樣中，提供包含可用於治療、預防及/或診斷上述病症之材料的本發明製造物件。該製造物件包含一容器及一位於該容器上或與該容器相連的標籤或包裝說明書。適合的容器包括(例如)：瓶子、小瓶、注射器等等。該等容器可由諸如玻璃或塑料等多種材料製成。該容器包含一其自身或當與另外組合物組合時可有效治療、預防及/或診斷病況之組合物且可具有一無菌存取通道(舉例而言，該容器可係靜脈注射溶液袋或具有一可藉由皮下注射針頭刺穿之塞子的小瓶)。該組合物中至少一活性劑係本發明抗體。該標籤或包裝說明書指示該組合物係用於治療諸如癌症等特定病症。此外，該製造物件可包含(a)其中包含一組合物之第一容器，其中該組合物包含一本發明抗體；及(b)其中包含一組合物之第二容器。在本發明此實施例中該製造物件可進一步包含一指示該第一及第二抗體組合物可用於治療一諸如癌症之特定病況的包裝說明書。或者或另外，該製造物件可進一步包含含有醫藥上可接受之

緩衝劑(例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏(Ringer's)溶液及葡萄糖溶液)之第二(或第三)容器。其可進一步包括自商業及用戶角度考慮所期望之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋液、濾器、注射針頭、及注射器。

以下係本發明方法及組合物之實例。應瞭解，理解上文提供的一般說明後，可實踐多種其他實施例。

實例

在實例1至12中，使用以下材料及方法。

基因表現

使用RNA STAT-60根據製造商的實驗設計說明(Tel-test "B"公司)自冰凍的組織試樣中提取出全部RNA。使用製造商的實驗設計方案(Qiagen)用RNeasy套組分離來自培養細胞之全部RNA。使用DNA-free套組(Ambion; cat#1906)去除污染DNA並將該等試樣用於實時PCR。使用Primer Express 1.1 (PE Applied Biosystems)設計針對人類FGF19、FGFR4及RPL19 mRNA(表2)之特異性引物及螢光探針，並用於對基因表現進行定量。將基因特異性信號對RPL19持家基因之信號進行歸一化。針對每種情況，求一式三份數據的平均值。

表 2

	正向引物	反向引物	探針
CYP7α1	CCATGATGCAAA ACCTCCAAT (SEQ ID NO:11)	ACCCAGACAGCG CTCTTTGA (SEQ ID NO:12)	TGTCATGAGACCT CCGGGCCTTCC (SEQ ID NO:13)
GAPDH	AATTTGCCGTGA GTGGAGTC (SEQ ID NO:14)	CAGTGGCAAAGT GGAGATTGT (SEQ ID NO:15)	CCATCAACGACC CCTTCATTGACCT C (SEQ ID NO:16)
FGF19	AGACCCCAAGTC TTGTCAATAAC (SEQ ID NO:17)	AATATCATGTTGG AAAACCAAGTG (SEQ ID NO:18)	CCGCTGCTTCCAC ACAGCAA (SEQ ID NO:19)
FGFR4	GCTCTTGACGGG AGCATT (SEQ ID NO:20)	CGCCATTTGCTCC TGTTT (SEQ ID NO:21)	GCAGGCTTCCAG CTTCTC (SEQ ID NO:22)
RPL19	AGCGGATTCTCA TGGAACA (SEQ ID NO:23)	CTGGTCAGCCAG GAGCTT (SEQ ID NO:24)	TCCACAAGCTGA AGGCAGACAAGG (SEQ ID NO:25)

原位雜交

藉由聚合酶鏈反應 (Mauad 等人，(1994) Am J Pathol 145, 1237-1245) 生成對應於人類 FGFR4 (NM_022963 之核苷酸 435 至 1183) 或 FGF19 (NM_005117 之核苷酸 495 至 1132) 之經 ³³P-UTP 標記的有義或反義探針。對切片實施去石蠟化，並於 37°C 下在 4 毫克/毫升蛋白酶 K 中對其實施 30 分鐘的脫蛋白化，且並進一步實施處理以達成原位雜交 (Holcomb 等人 (2000) Embo J 19, 4046-4055)。在 55°C 下經整夜將探針雜交至切片上，並藉由 RNase A 處理將未雜交

探針去除。將載玻片浸入NBT2乳液(Eastman Kodak)，在4℃下曝光4周，實施顯影並用蘇木精和伊紅實施複染色。

免疫沉澱作用及免疫印跡

在500微升萃取緩衝劑(20 mM Tris pH 8, 137 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 1.5 mM MgCl₂, 完全蛋白酶抑制劑混合劑(Roche Applied Sciences))中對組織試樣(50毫克)實施均質化。用萃取緩衝劑將來自培養細胞之全部蛋白質萃取至冰上保持30分鐘。對溶解產物實施離心(10,000 X g, 15分鐘)並隨後在4℃下用Cibacron藍瓊脂糖及蛋白質G-瓊脂糖(GE Healthcare Life Sciences)實施清除過夜。在4℃下於1毫升含有2微克瓊脂糖偶合的目標抗體之PBS/0.1% Triton中對溶解產物(100微克蛋白質)實施1小時培養。用相同的緩衝劑對凝膠漿液液實施洗滌，並用10微升Elution buffer(Pierce Biotechnology)進行洗脫。藉由西方印跡法使用2微克生物素化的FGF19抗體(BAF969; R&D系統)、FGFR4樣品(Genentech公司)及IRDye 800偶聯的第二試劑對試樣實施分析並使用Odyssey掃描器(Li-Cor Biotechnology)使其顯影。

免疫組織化學

使用Trilogy (Cell Marque)對經福爾馬林固定的石蠟包埋組織切片進行處理以實現抗原回收，並隨後用10微克/毫升FGF19抗體(1D1; Genentech公司)實施培養。使用生物素化的二級抗體、ABC-HRP試劑(Vector Labs)及金屬增強的DAB比色過氧化物酶底物(Pierce Laboratories)完成免疫染

色。

細胞遷移分析

在4°C下用存於0.02 M乙酸中之50微升1型膠原(50微克/毫升)對8微米孔隙率24-孔式PET膜濾器(BD Biosciences)之表面實施塗覆過夜。向上室中加入存於包含0.1% BSA之無血清最小必需培養基中之細胞(5×10^4)。向下室中充滿相同的培養基，並在37°C下對板實施培養。第二天，用棉頭拭子擦拭上室，並對遷移至插片下側的細胞實施染色並在顯微鏡下進行讀數。針對每種情況，求一式三份數據的平均值。

固相受體結合測試

在4°C下用50微升2微克/毫升抗-人免疫球蛋白Fc γ 片段特異性抗體(Jackson ImmunoResearch)對Maxisorb 96孔板實施塗覆過夜並用其捕獲1微克/毫升FGFR-Fc嵌合蛋白質(R & D Systems)。用PBS/3%BSA使非特異性結合位點達飽和，並在葡萄糖胺聚糖(Seikagaku公司)或低聚糖(Neoparin公司)存在下於PBS/0.3% BSA中對FGF19實施2小時培養。先用生物素化的FGF19特異性多株抗體(BAF969; R & D Systems)、再用抗生蛋白鏈菌素-HRP及TMB比色底物對FGF19結合進行檢測。

受體下拉測試

用存於包含10 mM HEPES pH 7.4及0.1% BSA之50:50 Dulbecco's Modified Essential Media:Ham F12中之400奈克FGF19或400奈克FGF1及肝素(200奈克)對FGFR-Fc嵌合蛋

白質(400奈克)實施1小時培養。添加蛋白質G-瓊脂糖(20微升)並另外實施30分鐘培養。基質用PBS/0.1% Triton-X100加以洗滌，用含有還原劑之SDS-PAGE試樣緩衝劑進行洗脫，並藉由西方印跡分析法利用生物素化的FGF19抗體(BAF969)或生物素化的FGF1抗體(BAF232; R&D systems)實施分析。

HSPG固相結合測定

在4°C下將硫酸類肝素蛋白多糖(Sigma)吸附至Maxisorb 96孔板上過夜。用PBS/3%BSA使非特異性結合位點達飽和，並用FGF19或FGF1(1:3連續稀釋液，自1微克/毫升至0.00017微克/毫升)(R & D Systems)對該等孔實施1小時培養。在過量肝素(10微克/毫升)存在下對非特異性結合量進行測定。用生物素化的特異性抗體及TMB比色底物對結合量進行檢測。藉由自總結合量中減去非特異性結合量計算特異性結合量。

肝素瓊脂糖結合測定

用存於含有10 mM HEPES pH 7.4及0.1% BSA之50:50 Dulbecco's Modified Essential Media:Ham F12中之20微升肝素瓊脂糖(GE Healthcare Life Sciences)對FGF19及FGF1蛋白質(皆係400奈克/毫升)實施1小時培養。凝膠漿液先用含有不同NaCl濃度的1毫升20 mM Tris(pH 7.4)實施洗滌，然後用含有20 mM NaCl之1毫升相同緩衝劑實施洗滌。結合的蛋白質用含有還原劑之SDS PAGE試樣緩衝劑進行洗脫並藉由西方印跡分析法實施分析。

FGF19單株抗體之生成

用 FGF19-His 依序對 Balb/c 小鼠實施免疫。具體而言，用懸浮於 MPL-TDM(Ribi Immunochemical Research 公司，Hamilton, Mont.) 中之 2.0 微克 hu FGF-19-His 在 Balb/c 小鼠之各後足墊中實施 9 次免疫(以兩周間隔)。最末次追加劑量三天後，採集脾臟並用 35% 聚乙二醇使膝後彎處淋巴結細胞與鼠骨髓瘤細胞 P3X63Ag8.U.1(ATCC CRL1597)融合。在 HAT 培養液中對雜交瘤實施選擇。該融合十天後，藉由 ELISA 針對與 hu FGF-19 結合的 mAb 對雜交瘤培養上清液實施篩選。藉由有限稀釋對可產生抑制人類 FGF-19 之抗體的細胞系實施兩次選殖。對所選擇的可產生 FGF19 抗體的雜交瘤實施兩次亞選殖以確保單選殖性。對純系實施接種以產生腹水，並藉由蛋白 A-瓊脂糖親和層析法對抗體實施純化。

使用標準方法自產生該等抗體之雜交瘤細胞中提取出全部 RNA。利用 RT-PCR 用重鏈及輕鏈的簡並引物對可變輕鏈(VL)及可變重鏈(VH)結構域實施擴增。正向引物對於 VL 及 VH 區域之 N-末端胺基酸序列具有特異性。分別對 LC 及 HC 反向引物進行設計以對合至一位於恆定輕鏈(CL)及恆定重鏈結構域 1(CH1)中的區域(其在各物種間係高度保守的)。將擴增的 VL 及 VH 選殖至哺乳動物表現載體中。使用常規序列測定方法測定該嵌入部分之多核苷酸序列。

抗體結合親和性及動力學的分析

針對結合動力學，採用使用 BIAcore™-3000 之表面電漿

共振 (SRP) 測定法 (BIAcore 公司, Piscataway, NJ)。簡言之, 根據供應商技術說明書用 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) 及 N-羥基琥珀醯亞胺 (NHS) 對羧甲基化的葡聚糖生物感測器晶片 (CM5, BIAcore 公司) 實施活化。用 10 mM 乙酸鈉 (pH 4.8) 將抗-FGF19 或 FGFR4 抗體稀釋至 5 微克/毫升, 然後以約 5 微升/分鐘之流速注入, 以達到大約 500 響應單位 (RU) 的偶合抗體。然後, 注入 1 M 乙醇胺以封阻未反應基團。對於動力學量測, 在 25°C 下以 25 微升/分鐘之流速將 FGF19-His 或 FGFR4 分子 (0.7 nM 至 500 nM) 之兩倍連續稀釋液注入含有 0.05% Tween 20 之 PBS 中。使用簡單的一對一 Langmuir 結合模型 (BIAcore Evaluation Software 3.2 版) 計算締合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off})。平衡離解常數 (K_d) 按比率 k_{off}/k_{on} 進行計算。

抗體抗原決定部位刪除

在含有 50 微升瓊脂糖偶合抗體之 50 mM Tris (pH 7.4) 中對 FGF19 蛋白質 (10 微克) 實施 2 小時培養。在 37°C 下於 100 mM 碳酸氫銨 (pH 8) 中對樹脂實施洗滌並用 0.1 微克胰蛋白酶 (Promega) 實施消化。對凝膠漿液實施洗滌, 結合的肽用 10% 的三氟乙酸 (TFA) 洗脫並藉由 MALDI-TOF-MS (Voyager; Applied Biosystems) 實施分析。對候選肽實施碰撞誘導解離 (QSTAR) 並實施人工測序以鞏固肽質譜鑑定 (圖 S1)。

固相抗體結合測定

用 PBS/3% BSA 使經 HisGrab Nickel 塗覆板 (Pierce) 之非

特異性結合位點飽和。用存於PBS/0.3% BSA之1微克/毫升FGF19-His對該等孔實施1小時培養。對該等板實施洗滌，並於PBS/0.3% BSA中在存在或不存在FGF19肽之情況下用FGF19抗體(濃度自1微克/毫升至0.000017微克/毫升)實施1小時培養。使用HRP偶聯的抗-小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch)及TMB過氧化物酶比色底物(KPL)對結合的抗體實施檢測。

*CYP7 α 1*表現分析

在無血清Dulbecco's Modified Essential Media:Ham F12 (50:50)中使HEP3B細胞在無養料環境中過夜，並在存在或不存在抗體1A6、1A1或同種型-配對對照抗體(其皆係自10微克/毫升至0.04微克/毫升之範圍的濃度)之情況下用100奈克/毫升FGF19實施6小時處理。藉由半定量的RT-PCR使用基因特異性引物及探針(Taqman ABI PRISM 7700, Applied Biosystems)對CYP7 α 1表現實施評估，並針對GAPDH表現實施歸一化。針對每種情況，求一式三份數據的平均值。

*FGFR4/MAPK*磷酸化

在存在或不存在抗體之情況下用40奈克/毫升FGF19對無血清培養基中之整夜未吸收營養的HEP3B細胞實施10分鐘處理。將細胞溶解於添加了10 mM NaF、1 mM原鈳酸鈉、及完全蛋白酶抑制劑錠劑(Roche)之R27A緩衝劑(Upstate)中。製備溶解產物，實施電泳並藉由西方印跡分析法使用磷酸基-FRS2、磷酸基-MAPK及MAPK特異性抗

體(Cell Signaling)及FRS2特異性抗體(Santa Cruz)實施分析。

異種移植實驗

所有動物實驗方案皆由Institutional Animal Care and Use Committee核可。用 5×10^6 細胞(200微升/小鼠)同時對6至8週齡的無胸腺BALB/c小鼠(Charles Rivers公司)實施經皮下接種。經7天後，將產生了相等容積(約100毫米³)腫瘤之小鼠隨機分成多個小組($n=10$)，並每週經腹膜腔內實施兩次處理。用電子卡鉗對腫瘤實施量測(Fowler Sylvac Ultra-Cal Mark III)並用下式計算平均腫瘤體積： $(W^2 \times L)/2$ (W ，最小直徑； L ，最大直徑)。使用針對正態分佈之Student's t -檢驗分析統計學差異。認為 $P<0.05$ 的值係顯著的。

異種移植腫瘤中FGFR4、FRS2及 β -連環蛋白磷酸化

在包含50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、0.25%去氧膽酸鈉、1 mM NaF、1 mM 原鈳酸鈉及小蛋白酶抑制劑錠劑(Roche)之溶胞緩衝液中對自經對照物(gp120)及抗-FGF19(1A6)抗體處理的動物切下的腫瘤實施均質化。使用BCA蛋白質分析試劑(Pierce)對溶解產物蛋白質濃度進行測定。在4°C下用固定至蛋白A-瓊脂糖凝膠上之1微克抗-FGFR4抗體(純系1G7；Genentech公司)或抗-FRS2(UpState)抗體對等量蛋白質(100微克蛋白)實施2小時培養，同時實施輕緩旋轉。用溶胞緩衝液對基質實施洗滌，並在2x Laemmli緩衝劑中對免疫複

合體實施洗脫，煮沸、並實施微量離心。在 SDS-PAGE 上對蛋白質實施電泳，轉移至硝化纖維素膜上，並用磷酸酪胺酸抗體(1:1000稀釋液，4G10，UpState)進行探查。實施洗滌及用第二抗體實施培養後，藉由 ECL 檢測系統(Amersham)對免疫反應蛋白質實施目測檢驗。使用磷酸基-ERK2抗體(1:1000稀釋液，Santa Cruz Biotech)對 ERK2 磷酸化水平進行評估而無需預先的免疫沉澱作用，並使用一定向抑制 N-末端脫磷酸化的 β -連環蛋白的抗體(1:1000稀釋液，UpState)對 β -連環蛋白磷酸化進行評估而無需預先的免疫沉澱作用。將膜剝離(Pierce)並用適宜抗體再次實施探測以測定總蛋白質量。

FGF19 TG 小鼠肝細胞癌的顯微-CT 成像及分析

藉由使用 Fenestra-LC(一肝臟專用造影劑)之顯微-CT 成像對肝腫瘤實施鑑別。Fenestra-LC 係經碘化的甘油三酯，其可模擬乳糜微粒剩餘物並可利用內源脂質代謝途徑達成肝細胞造影劑聚集。該等試劑先前已被用作鑑別肝臟肝腫瘤的工具。(Lee 等人，1997；Weichert 等人，1996) 在 6 月齡時，用 Fenestra LC(Advanced Research Technologies 公司，Saint-Laurent，Quebec，Canada)(20 微升/克，經靜脈內)對 FGF19 轉基因小鼠實施注射，使之進行一有意識的 3 小時肝臟吸收，然後對其實施無痛致死術，並對切下的肝臟實施全量分析、稱重、離體顯微-CT 分析(μ CT 40 系統；Scanco Medical，Bassersdorf，Switzerland)及組織學染色。於紗布上對全肺實施輕微印跡並在浸沒於大豆油

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中為顯微-CT成像做好準備。對於各肝臟，以30毫米之各向同性體素大小獲取90分鐘掃描，使用512投影，積分時間為300毫秒，能量為45 keV，及管電流為177 μ A。用AnalyzeDirect(Lenexa, KS)的圖像分析軟體對體積圖像文件實施分析。用-16 Hounsfield Units (HU)之強度閾值自本底信號(大豆油)中分割出組織質量。用第二閾值(26 HU)估計與積聚了造影劑導致產生界定正常肝組織高強度區域之功能性肝組織相關的肝組織體積。其中由於造影劑濃度小而具有最低衰減的FGF19轉基因小鼠肝組織(包括脈管系統、膽囊及膽管)及肝細胞癌損傷顯示較低強度。自FGF19轉基因對照及經處理組兩者中皆減去野生型FVB小鼠(其不具有肝細胞癌)之全部低強度肝體積之平均值以獲得僅與腫瘤相關的體積。將數據表示為腫瘤體積佔全部肝體積之百分比。

統計分析

用不成對雙尾Student's t-檢驗對統計學顯著性實施分析。認為 $P < 0.05$ 的值係顯著的。將數據表示為：平均 $\pm$ s.e.m。

在實例13至17中，使用以下材料及方法：

細胞

在37 $^{\circ}$ C及5% CO₂之條件下將HCT116細胞(ATCC, Rockville, MD)按常規保持在包含10%無四環素胎牛血清及4毫莫耳/升左旋穀氨胺之RPMI 1640中。用媒劑或FGF19對未供應血清的細胞實施培養(25至100奈克/毫升，

10分鐘)。在分開的實驗中，用對照抗體(gp120)或FGF19抗體(1A6，10微克/毫升)對細胞實施3至24小時處理。為進一步評估對 β -連環蛋白激活的影響，以1 μ M濃度用蛋白酶體抑制劑MG132(Biomol，Plymouth Meeting，PA)對細胞實施4小時處理，隨後再用抗-FGF19 mab 1A6實施24小時處理，以評估 β -連環蛋白上Ser33/Ser 37、Ser 45及Thr41之磷酸化。經培養後，在冷的PBS中對細胞實施洗滌，並實施溶解用於蛋白或RNA分析。

免疫沉澱作用及西方印跡分析

將細胞溶解於改進的RIPA緩衝劑(50 mM Tris-Cl, pH 7.5；150 mM NaCl；1% IGEPAL；1 mM EDTA；0.25% 去氧膽酸鈉；1 mM NaF；1 mM Na_3VO_4 ；蛋白酶抑制劑混合物(Sigma-Aldrich，St. Louis，MO))中並藉由離心法進行清除。用BCA蛋白質分析試劑(Pierce，Rockford，IL)測定溶解產物之蛋白質濃度。在4°C下用固定於蛋白A-瓊脂糖凝膠(Sigma-Aldrich)上之特異性抗體對等量蛋白質實施2小時培養，同時實施輕緩旋轉。用溶胞緩衝液對珠子實施徹底洗滌，並在2X Laemmli緩衝劑中對免疫複合物實施洗脫，並實施煮沸及微離心。在SDS-PAGE上對蛋白質實施解析，轉移至硝化纖維素膜上並用特異性初級抗體實施培養。洗滌並用二級抗體培養後，藉由ECL檢測系統(Amersham，Arlington Ht. IL)對免疫反應蛋白實施目測檢驗。用於免疫沉澱作用及免疫印跡分析之抗體係得自BD Transduction (San Diego，CA)之抗- β -連環蛋白mAb、得自

UpState Biotech(Charlottesville, VA)之定向抑制N-末端脫磷酸化 β -連環蛋白之抗-活性- β -連環蛋白抗體、抗-磷酸酪胺酸(4G10)及抗-E-鈣黏蛋白抗體、得自Cell Signaling(Danvers, MA)之抗-磷酸基- β -連環蛋白(Ser33/Ser37及Ser45/Thr41特異性的)抗體及抗-FGFR4 mAb(1G7)(Genentech公司)。當指明時，將膜剝離(Pierce)並用另一抗體實施再探測。用Adobe Photoshop cs2 9版(Adobe Systems, Mountain View, CA)對特異蛋白帶之密度實施分析。藉由使用自三次單獨實驗獲得的數據確定介於總蛋白與磷酸化部分之間的比率對 β -連環蛋白及E-鈣黏蛋白之酪胺酸及Ser/Thr磷酸化實施定量分析。

液相層析法-質譜/質譜(LC-MS/MS)

使用線性離子阱質譜測定法對N末端 β -連環蛋白磷酸化水平實施間接量化。自先經MG132預處理再經對照物(gp120)或抗-FGF19 mab 1A6處理之細胞對 β -連環蛋白實施免疫沉澱，並利用Tris-Gly SDS PAGE實施分離。對凝膠實施考馬斯(Coomassie)染色，並將 β -連環蛋白帶切下在室溫下於10 mM DTT中實施30分鐘還原，並在室溫下用50 mM碘乙醯胺對半胱胺酸實施15分鐘烷基化，然後實施胰蛋白酶消化。在存於50 mM碳酸氫鈉(pH 8.0)中之胰蛋白酶(10奈克/微升)中對肽進行消化，並將肽混合物(3毫升)裝載至充滿了Vydac 214MS低-TFA C4珠子之0.25 x 30毫米捕獲筒中。將此筒與一充滿Vydac 218MS C18珠子之0.1 x 100毫米分離柱成一直線放置。使用經牽引至15毫米金屬

塗覆尖端的"picofrit" (New Objective)熔化矽石毛細管(其形成微電噴射發射器)對分離柱實施構造。以0.3毫升/分鐘之流速用含有0.1%甲酸之梯度乙腈對肽實施1小時洗脫。利用線性離子阱儀器(LTQ; Finnigan)實施數據依賴型串列質譜測定。利用Sequest數據庫搜索程式生成各CID頻譜之交互相關得數。藉由人工判讀碰撞誘導解離波譜對僅藉助單肽匹配的蛋白質進行確定。人工確定磷酸化肽。然後對峰面積實施整合以確定肽的相對豐度。

Wnt-靶基因表現分析

按照製造商的實驗設計說明用 Qiagen RNA分離套組 (Qiagen, CA)及經處理的 DNase(Applied Biosystems, Foster City, CA)分離出全部RNA。使用ND-1000分光光度計(Wilmington, DE)測定RNA濃度。實施即時定量PCR以測定Wnt-靶基因(細胞週期蛋白D1、CD44、E-鈣黏蛋白、c-jun)mRNA之相對豐度。用FAM(5'端)及TAMRA(3'端)對探針進行標記。引物探針序列如下示：

人類細胞週期蛋白D1正向：GCT GCT CCT GGT GAA CAA GC (SEQ ID NO:26)；

反向：TGT TCA ATG AAA TCG TGC GG (SEQ ID NO:27)；

探針：CAA GTG GAA CCT GGC CGC AAT GAC (SEQ ID NO:28)；

人類CD44正向：GAA AAA TGG TCG CTA CAG CAT CT (SEQ ID NO:29)；

反 向 : GGT GCT ATT GAA AGC CTT GCA (SEQ ID NO:30) ;

探 針 : CGG ACG GAG GCC GCT GAC C (SEQ ID NO:31) ;

人 類 E-鈣 黏 蛋 白 正 向 : GAC TTG AGC CAG CTG CAC AG (SEQ ID NO:32) ;

反 向 : GTT GGT GCA ACG TCG TTA CG (SEQ ID NO:33) ;

探 針 : CCT GGA CGC TCG GCC TGA AGT G (SEQ ID NO:34) ;

人 類 c-jun 正 向 : CGT TAA CAG TGG GTG CCA ACT (SEQ ID NO:35) ;

反 向 : CCC GAC GGT CTC TCT TCA AA (SEQ ID NO:36) ;

探 針 : ATG CTA ACG CAG CAG TTG CAA ACA (SEQ ID NO:37) ;

人 類 特 異 性 核 糖 體 蛋 白 L-19 (RPL-19) :

正 向 : AGC GGA TTC TCA TGG AAC A (SEQ ID NO:38) ;

反 向 : CTG GTC AGC CAG GAG CTT (SEQ ID NO:39) ;

探 針 : TCC ACA AGC TGA AGG CAG ACA AGG (SEQ ID NO:40) 。

擴 增 反 應 物 (50 微 升) 包 含 100 奈 克 RNA 模 板 、 5 毫 莫 耳 / 升

MgCl₂、1x緩衝劑A、1.2毫莫耳/升之dNTPs、2.5 U之TaqGold聚合酶、20 U的RNase抑制劑、12.5 U MuLV逆轉錄酶、2微莫耳/升之各正向及反向引物及5微莫耳/升之探針(Perkin Elmer)。熱循環(Perkin Elmer ABI Prism 7700序列檢測器)條件係48℃經30分鐘、95℃經10分鐘、95℃經15秒及60℃經1分鐘，共40個循環。使用序列檢測器1.6.3(PE Applied Biosystems)實施數據分析，並將目標基因的結果對RPL19基因實施歸一化。

ShRNA研究

使用包含shRNA表現穿梭質粒及包含一TetR-IRES-Puro盒之病毒載體骨架的pHUSH可誘導的載體系統(Hoeflich, KP等人, Cancer res 66:999-1006 (2006))。藉由設計定製的siRNA序列、將其轉入shRNA中並在293T細胞中之瞬時共轉染實驗中測試其效力來構建FGFR4組合式載體。將以下shRNA序列選殖至pShuttle-H1中，並隨後藉由Gateway(Invitrogen, Carlsbad, CA)重組反應將H1-shRNA盒轉移至pHUSH-GW中：

FGFR4 shRNA2正向：GAT CCC CCC TCG TGA GTC TAG ATC TAT TCA AGA GAT AGA TCT AGA CTC ACG AGG TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO:41)；

反向：AGC TTT TCC AAA AAA CCT CGT GAG TCT AGA TCT ATC TCT TGA ATA GAT CTA GAC TCA CGA GGG GG (SEQ ID NO:42)；

FGFR4 shRNA5正向：GAT CCC CGA ACC GCA TTG

GAG GCA TTA TCA AGA GAA ATG CCT CCA ATG CGG
TTC TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO:43) ;

反向 : AGC TTT TCC AAA AAA GAA CCG CAT TGG
AGG CAT TTC TCT TGA TAA TGC CTC CAA TGC GGT
TCG GG (SEQ ID NO:44) ;

hEGFP對照正向 : GAT CCC CGC AGC ACG ACT TCT
TCA AGT TCA AGA GAC TTG AAG AAG TCG TGC TGC
TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO:45) ;

反向 : AGC TTT TCC AAA AAA GCA GCA CGA CTT
CTT CAA GTC TCT TGA ACT TGA AGA AGT CGT GCT
GCG GG (SEQ ID NO:46) 。

藉由序列測定對所有結構進行檢驗。

可誘導-shRNA細胞純系之生成

用LipofectAmine 2000 plus(Invitrogen)對HCT116細胞實施轉染。由於載體中編碼的嘌呤黴素抗性基因係處於組成型β-肌動蛋白啟動子之控制下，故採用5微克/毫升嘌呤黴素來選擇表現shRNA的經轉染細胞。分離出穩定純系，用1微克/毫升強力黴素(doxycycline)(BD Clontech, San Jose, CA)實施7天處理以誘導siRNA之表現。藉由西方印跡分析法對功能性FGFR4蛋白抗擊倒性實施評價。

統計分析

用Student's雙尾t檢驗法對兩組間的數據進行比較。利用單向方差分析法及Dunnett's檢驗法對三組或更多組間的數據進行比較。據認為，P-值 <0.05係在統計學上顯著的。

實例 1：人類組織中 FGF19 及 FGFR4 表現的分析

在人類結腸腺癌、肺扁平細胞癌 (SCC) 及肝細胞癌 (HCC) 中對 FGF19 及 FGFR4 蛋白質表現進行評估。FGF19 在相對於正常組織 6/10 的結腸腺癌 (圖 2A) 中及在 7/10 的肺 SCC 中 (圖 2B) 發生了過表現。與正常組織相比較，FGFR4 表現在結腸腫瘤中無顯著改變，但在 SCC 中顯示了下調 (圖 2A 及 2B)。

為使 FGF19 及 FGFR4 mRNA 表現局部化，實施原位雜交。在結腸腺癌及肺 SCC 中兩種基因之信使 RNA 在瘤形成上皮細胞中皆係顯著的 (圖 2C 及 D)。在一包含 35 個結腸癌病例之組織微陣列中，26 個病例 (74%) 具有 FGF19 mRNA 的陽性信號及 27 個病例 (77%) 具有 FGFR4 mRNA 之陽性信號。利用抗-FGF19 抗體之治療針對非源自腫瘤的 FGF19 及源自腫瘤的 FGF19 兩者，因此抗-FGF19 治療可能在缺乏 FGF19 表現的 FGFR4-陽性腫瘤中具有臨床益處。表 3 顯示在結腸腺癌組織微陣列試樣中 FGFR4 及 / 或 FGF19 mRNA 之共表現之存在或不存在：

表 3：結腸腺癌

	FGFR4+	FGFR4-
FGF19+	21 (60%)	5 (14%)
FGF19-	6 (17%)	3 (9%)

在大多數腫瘤試樣中觀察到了結腸腺癌中介於 FGF19 及 FGFR4 之存在之間的重疊。在 14 個肺 SCC 病例中，14 個病例 (100%) 具有 FGF19 mRNA 之陽性信號及 13 個病例 (93%)

具有 FGFR4 mRNA 之陽性信號。另外，藉助免疫組織化學法，瘤形成上皮細胞在結腸腺癌(圖 2C)及肺 SCC(圖 2D)兩者中皆顯示了強 FGF19 蛋白染色。該等相對較高的表現頻率表明，肺 SCC 中在 FGF19 及 FGFR4 之存在之間具有一顯著的重疊。

因為在轉基因小鼠中系統性 FGF19 表現可增進肝細胞癌(HCC)(Nicholes 等人，2002)，亦可對肝試樣中的 FGF19 及 FGFR4 mRNA 表現進行評估。在 50 個肝細胞癌病例中，23 個病例 (46%) 顯示了 FGF19 mRNA 陽性信號及 30 個病例 (60%) 顯示了 FGFR4 mRNA 陽性信號。兩基因皆表現於瘤形成肝細胞中(代表性實例示於圖 2E 中)。藉助免疫組織化學法，瘤形成肝細胞亦顯示強 FGF19 蛋白質染色(圖 2E)。表 4 顯示在結腸腺癌組織微陣列試樣中 FGFR4 及 / 或 FGF19 mRNA 之共表現之存在或不存在：

表 4：HCC

	FGFR4+	FGFR4-
FGF19+	21 (41%)	4 (8%)
FGF19-	11 (22%)	15 (29%)

在較大百分比之試樣中觀察到了介於 FGFR4 及 FGF19 表現間的重疊。

該等結果顯示，FGF19 及 FGFR4 表現於若干類型的人類癌症中。

因為肝硬化通常發生於肝細胞癌之前，在肝硬化中對 FGF19 mRNA 表現進行評估。在再生成的瘤肝細胞中，該等試樣顯示了強 FGF19 mRNA 及蛋白質信號(圖 2F)，表明

在肝瘤形成增進期間FGF19表現發生於初期。

藉由原位雜交在若干類型的原發性上皮腫瘤中對FGF19 mRNA表現亦進行評估。在16/38 (42%)的乳腺癌病例、39/70 (56%)的卵巢腺癌病例及8/79 (10%)的胰腺癌病例中對FGF19 mRNA表現進行檢測。該等結果顯示，FGF19 mRNA在若干類型之原發性腫瘤中進行表現。另外，利用免疫組織化學法關於FRFR4蛋白之表現對一組結腸腺癌實施篩選，18/20試樣對於FGFR4表現呈陽性。

● 實例2：FGF19及FGFR4表現於人類腫瘤細胞系及異種移植組織中

在一組結腸、乳房及肝腫瘤細胞系中對FGF19及FGFR4 mRNA及蛋白質表現進行分析。發現，FGF19 mRNA表現在一組結腸癌細胞系之子集中表現，包括 Colo201、Colo205、SW620、SW480及HCT116(圖3A)。所檢測的SNU185、SNU398、MCF7及所有結腸癌細胞系表現了FGFR4 mRNA。利用西方印跡分析法在一組癌細胞系中對FGF19及FGFR4蛋白表現進行測定。除HT29外(其未表現FGF19蛋白)，FGF19及FGFR4蛋白含量與該等細胞系中其mRNA表現係一致的(圖3B)。該等細胞系分泌的FGF19之電泳遷移率與預計的24 kDa之分子量係一致的。然而，亦檢測到了額外的低分子量帶，可能表示平截的蛋白質。

為驗證FGF19蛋白質表現係保持在活體內，藉由免疫組織化學法對源自結腸癌細胞系的腫瘤異種移植體進行評估

(圖 3C 及 3D)。Colo205 異種移植腫瘤組織在整個腫瘤之所有瘤形成上皮細胞中具有強 FGF19 表現，但在相關的小鼠間質或相鄰正常組織中不這樣。SW620 及 HCT116 異種移植植物在分散的瘤形成細胞中顯示了陽性免疫反應性。FGF19 陰性 HT29 細胞系異種移植植物之免疫組織化學法未顯示任何染色。該等結果表明，當在培養盤中活體外生長時以及在皮下異種移植環境中活體內生長時，結腸癌細胞系可表現 FGF19。

實例 3：FGF19 非係肝素-結合因子

實施葡糖胺聚糖結合測試以直接評定 FGF19 蛋白質與肝素是否相互作用。在一固相結合測試中，FGF1 顯示一與表面吸附的純化硫酸類肝素蛋白多糖的劑量依賴性結合(圖 4A)。藉由對比，FGF19 不與該經塗覆物結合。在一下拉測試中，FGF1 與肝素瓊脂糖親和性基質強力結合。如先前所報告，僅以包含濃度高於 1 M 之 NaCl 的緩衝劑可使 FGF1 脫吸附。藉由對比，在所測試的最低 NaCl 濃度 (20 mM) 下 FGF19 未顯著地與肝素瓊脂糖結合，且當用較高的 NaCl 濃度實施洗滌後不能再檢測到蛋白質(圖 4B)。同時，該等結果表明，FGF19 未與葡糖胺聚糖顯著結合，且因此不能認為其係肝素結合因子。

實例 4：FGF19 特異性地與 FGFR4 結合

先前的免疫共沉澱研究暗示，FGF19 之受體結合特異性僅限於 FGFR4 (Xie 等人，1999)。為更完全地檢驗 FGF19 之結合特異性，對其與所有已知人類 FGFR (以其不同的可選

拼合形式，包括近期鑒定的FGFR5(FGFR1L))之相互作用進行了評定(Sleeman等人，2001)。在一固相測試中，FGF19劑量依賴性結合僅限於FGFR4(圖4C)。在一受體下拉測試中，FGF1與所有FGFR結合，其中FGF19相互作用僅限於FGFR4(圖4D)該等結果與先前發現(Ornitz等人，1996；Xie等人，1999)係一致的且進一步強調了FGF19對FGFR4之獨特的結合特異性。

實例5：藉由葡糖胺聚糖對FGF19與FGFR4之結合進行調節

利用固相受體結合測試對FGF19與FGFR4結合之葡糖胺聚糖需要的特異性進行分析。如圖4E中所示，肝素構成了最有效的FGF19與FGFR4相互作用的啟動子($EC_{50}=0.0025$ 微克/毫升)，隨後為硫酸乙醯肝素($EC_{50}=0.9$ 微克/毫升)、硫酸軟骨素B($EC_{50}=1$ 微克/毫升)及硫酸軟骨素A($EC_{50}=4$ μ g/毫升)。硫酸軟骨素C未促進FGF19與FGFR4之結合。

亦對多種長度的肝素多糖對FGFR4結合促進作用的影響進行分析。肝素八糖在最高濃度下(10微克/毫升)僅顯示對FGFR4結合之最小影響(圖4F)。使用肝素十糖及更長片段時，觀察到了對FGF19與FGFR4之劑量依賴性促進作用，且此影響與肝素分子量成比例。總之，該等結果顯示，肝素構成了最有效的支持FGF19與FGFR4結合的葡糖胺聚糖，肝素的活性與其分子量成比例。

實例6：FGF19以高親和性與FGFR4結合

藉由在存在或不存在過量未經標記配體之情況下用固定

的 FGFR4 及肝素培養增大濃度的 [¹²⁵I]FGF19，對 FGF19 與 FGFR4 之結合親和性進行評定。FGF19 顯示了一劑量依賴的及可飽和的與 FGFR4 之結合 (圖 4G，插圖)。利用 Scatchard 分析法，對於與 FGFR4 結合之 FGF19 測得一 0.25 nM 之 K_D，證實了配體與受體以高親和性相互作用。

實例 7：抗-FGF19 單株抗體之生成

按上文所述，生成一組抗-FGF19 小鼠單株抗體。使用常規序列測定方法測定該嵌入部分之多核苷酸序列。抗-FGF19 mab 1A6 VL 及 VH 胺基酸序列示於圖 1 中。

實例 8：用表面電漿共振法及酶聯免疫吸附測試法對抗-FGF19 單株抗體結合親和性進行分析

為測定小鼠抗-FGF19 Mab 之結合親和性，按上文所述利用一 BIAcore™-3000 (BIAcore 公司，Piscataway, NJ) 實施表面電漿共振 (SRP) 量測。此分析結果示於表 5 中。

表 5

抗體	Kd	Kon	Koff
1A6(抗-FGF19)	< 9 pM	5.6 X 10 ⁵ (M ⁻¹ s ⁻¹)	< 5 X 10 ⁻⁶ (s ⁻¹)
1D1(抗-FGF19)	32 nM	2.4 X 10 ⁴ (M ⁻¹ s ⁻¹)	7.7 X 10 ⁻⁴ (s ⁻¹)
1A1(抗-FGF19)	~300 nM	1 X 10 ⁶ (M ⁻¹ s ⁻¹)	3 X 10 ⁻² (s ⁻¹)

在酶聯免疫吸附測試法中，抗-FGF19 mab 1A1 及 1A6 以 40 pM 之可比較 EC₅₀ 與 FGF19 結合，然而抗-FGF19 mab 1D1 以 400 pM 之 EC₅₀ 結合 (圖 5A)。在固相受體結合測試中，1A6 阻斷的 FGF19 以 3 nM 之 IC₅₀ 與 FGFR4 結合 (圖 5B)。1A1、1D1 及一無關對照抗體未抑制此相互作用。

實例 9：在一基於細胞之分析中抗-FGF19 抗體阻斷

FGF19信令

實施若干基於細胞的測試，以測定抗-FGF19抗體是否可阻斷FGF19與FGFR4之相互作用。

FGF19藉由抑制膽固醇-7- α -羥化酶1(Cyp7 α 1)(膽固醇及膽汁酸合成的限速酶)之肝臟表現而在膽固醇內環境穩定中起重要作用(Gutierrez等人，(2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 301-306；Yu等人，(2000) *J Biol Chem* 275, 15482-15489)。用如上文所述肝細胞癌 HEP3B 細胞 (Schlessinger, *Science* 306:1506-1507 (2004))對抗-FGF19抗體1A1及1A6、或同種型-匹配的陰性對照抗體(濃度自10微克/毫升至0.04微克/毫升)阻斷由FGF19-誘導的對cyp7 α 1下調作用的能力進行評定。在不存在抗-FGF19抗體之情況下，FGF19處理使cyp7 α 1表現減小了75%(圖5D)。用1.1微克/毫升小鼠抗-FGF19 Mab 1A6進行處理消除了FGF19-誘導的對cyp7 α 1表現之抑制。藉助比較，以最高測試濃度(10微克/毫升)而非較低抗體濃度下用小鼠抗-FGF19 Mab 純系1A1進行處理僅使該抑制減小了50%。對照抗體之存在未影響FGF19活性。抗-FGF19抗體1A6抑制由FGF19誘導的對cyp7 α 1基因表現之下調作用的IC₅₀為約0.4微克/毫升。抗-FGF19抗體1A1抑制由FGF19誘導的對cyp7 α 1基因表現之下調作用之IC₅₀為約10微克/毫升。

對於抗-FGF19 mab 1A6，亦關於其在肝細胞癌 Hep3B 細胞中阻斷由FGF19-誘導的FGF途徑激活的能力進行測試 (Eswarakumar等人，(2005) *Cytokine Growth Factor Rev*

16:139-149 ; Schlessinger, J (2004) Science 306:1506-1507)。在不存在或存在陰性對照抗體之情況下用FGF19或用多種濃度的抗-FGF19單株抗體1A6或1D1(以30、10及3.3奈克/毫升)對半供給血清的肝細胞癌Hep3B細胞進行處理，並按上文所述測定FRS2及MAPK磷酸化。在所有測試劑量下，用抗-FGF19 Mab 1A6進行處理顯著阻斷了由FGF19-誘導的FRS2及MAPK磷酸化(圖5C)。藉由比較，用對照抗體及抗-FGF19 mab 1D1進行處理未顯示顯著的抑制活性。

因為FGFR4在細胞遷移中起重要作用，故對FGF19之趨化活性進行評定(Wang等人，(2005) Clin Cancer Res 10:6169-6178)。在一經改進的博伊登(Boyden)室測試中，FGF19以一劑量依賴形式促進了HCT116細胞遷移，在16奈克/毫升時達最大值。(圖10)。關於抑制由FGF19促進的細胞遷移之能力對抗-FGF19 mab進行測試。以0.1微克/毫升，用抗-FGF19 mab 1A6進行處理抑制了由FGF19誘導的細胞遷移(圖5E)。用較高濃度的1A6進行處理將細胞遷移降低到了低於基礎HCT116細胞遷移的水平，其可能係藉由抑制外源加入的及內源產生的FGF19而實現。

該等結果顯示，抗-FGF19抗體1A6係一有效的活體外FGF19活性抑制劑。

實例10：抗體1A6結合決定簇集中於FGF19與FGFR4之結合介面中

用一質譜測定法對抗-FGF19 Mab 1A6及1A1抗原決定部

位進行定位以評估FGF19構象組份是否有助於其結合。首先試圖利用瓊脂糖耦合的1A6親和性基質自FGF19胰蛋白酶消化液分離出一包含抗原決定部位之肽。此方法可能會不成功，因為FGF19斷裂危害了1A6抗原決定部位之構象完整性。為測試此假說，對操作程序進行了改進，並用瓊脂糖耦合的抗體對FGF19實施培養，然後用胰蛋白酶對吸附的蛋白實施消化。對全部消化液的分析顯示，所吸附的FGF19完全斷裂，任何胰蛋白酶分裂位點皆無1A6掩蔽現象(圖6A)。對基質實施徹底洗滌，對所結合的肽實施洗脫並藉助質譜測定法進行鑑別。在一平行實驗中用一與瓊脂糖耦合的無關對照抗體對非特異性結合的肽進行鑑別。

此分析結果示於圖6中。瓊脂糖耦合的抗-FGF19 mab 1A6特異性地識別了FGF19肽G133-R155(圖6B及8A)。瓊脂糖耦合的抗-FGF19 mab 1A1特異性地識別了肽G156-R180(圖6C及8B)。

因為抗-FGF19 mab 1D1與瓊脂糖之偶聯取消了其與FGF19的結合，故用肽競爭結合測定法來鑑別其抗原決定部位。僅FGF19胺基酸類A183-G192與mab 1D1競爭結合(圖6D)。此肽未與mab 1A1競爭與FGF19之結合。因為此競爭測試中利用了重疊肽，故推測，mab 1D1抗原決定部位係位於最後4個末端FGF19胺基酸中(SFEK)。

將mabs 1A1、1D1及1A6之抗原決定部位描繪於先前所闡述的FGF19與FGFR4間相互作用之結構模型上(Harmer等人，(2004) Biochemistry 43, 629-640)。1A1及1D1之抗原決

定部位係位於FGF19之末端部分中--由於其缺乏有序結構而未在此模型中表示出來。然而，1A6抗原決定部位集中於FGF19與FGFR4之結合介面中(圖6E)。該等結果表明，抗-FGF19 Mab 1A6直接關閉了FGF19之受體結合位點。

實例 11：用抗-FGF19單株抗體進行處理抑制了活體內腫瘤生長

為測定FGF19中和是否能抑制活體內腫瘤生長，按上文所述在兩腫瘤異體移植模型中對抗-FGF19抗體進行測試。選用結腸癌細胞系HCT116及colo201，此乃因其可表現FGF19及FGFR4兩者(圖3A)，並在活體內形成腫瘤。另外，抗-FGF19抗體1A6顯示了一對由FGF19誘導的活體外HCT116細胞遷移之阻斷活性。

用5毫克/公斤之抗-FGF19 mab 1A6或一對照抗體對帶有已確定的HCT116異種移植腫瘤的小鼠實施每週兩次處理。在第35天時，與對照抗體治療組相比較，使用抗-FGF19 mab 1A6之處理顯著地抑制了57%的腫瘤生長($p=0.07$ ， $n=5$)(圖7A)。使用一更高劑量的抗體1A6(15毫克/公斤；2x周)重複此研究，觀察到一統計學上顯著的腫瘤生長抑制(60%生長抑制， $p=0.01$ ， $n=5$)。

為驗證抗-FGF19 mab 1A6藉由阻斷FGF19活性抑制了腫瘤生長，在FGFR4信令標記之研究結束時對腫瘤進行檢驗。與經對照抗體處理的動物相比較，在經抗-FGF19 mab 1A6處理之動物的腫瘤中FGFR4、FRS2、ERK及 β -連環蛋白之激活作用顯著減小(圖7B)。

之後，使用 Colo201 之異種移植物(一表現較 HCT116 更高之 FGF19 水平的結腸癌細胞系)(圖 1A)。與對照抗體相比較，用抗-FGF19 mab 1A6 進行處理(30 毫克/公斤；2X/周)顯著抑制了已經確定的 colo201 腫瘤的生長(在第 27 天，64% 生長抑制， $p=0.03$ ， $n=5$)(圖 7C)。對切下的腫瘤進行分析顯示，與對照抗體處理相比較，用抗-FGF19 mab 1A6 進行處理顯著地減小了異種移植腫瘤中 FGFR4、FRS2、ERK 及 β -連環蛋白激活作用(圖 7D)。該等結果證明瞭抗-FGF19 mab 1A6 於結腸癌模型中的效力並證明瞭其具有抑制 FGF19 依賴性 FGFR4、FRS2、ERK 及 β -連環蛋白激活之活性。

實例 12：在 FGF19 轉基因小鼠中，利用抗-FGF19 單株抗體之處理預防肝細胞癌及體重減輕

在轉基因小鼠骨骼肌中 FGF19 之過表現導致了在 10 至 12 月齡之前肝細胞癌之發展(Nicholes 等人，Am J Pathol. 160:2295-2307, 2002)。為證實 FGF19 在此模型中起到了腫瘤促進劑之作用，用一腫瘤誘發劑(二乙基亞硝胺(DEN))對 FGF19 轉基因小鼠進行處理，其使腫瘤形成加速了 50%。為測定抗-FGF19 mab 1A6 是否可以預防肝細胞癌，用 1A6 或對照抗體(抗-gp120)對經 DEN-催速的 FGF19 轉基因小鼠實施 6 個月的處理。在該處理結束時，所有經對照處理的小鼠皆具有很明顯的遍及肝葉之多病灶巨大肝細胞癌，然而經抗-FGF19 mab 1A6 處理的動物不具有肝腫瘤或(在一病例中(#1862))具有個別存在於中葉膈面上之小腫瘤

(圖 9A)。經抗-FGF19 Mab 1A6-處理之小鼠的肝重量(平均 $=1.71\pm0.05$ 克)顯著低於經對照處理之小鼠的肝重量(平均 $=3.15\pm0.58$ 克； $p=0.014$)，但並非顯著不同於正常FVB野生型小鼠之彼等(平均 $=1.56\pm0.08$ 克； $p=0.82$)。另外，藉由顯微-CT影像分析法對腫瘤體積進行測定，用正常FVB肝實施校正，並繪示為總肝體積之百分比(圖 9B)。經抗-FGF19 Mab 1A6處理之小鼠的百分比腫瘤體積(平均 $=7.5\pm3.2\%$)顯著低於經對照 gp120 處理之小鼠(平均 $=23.8\pm6.8\%$ ； $p=0.05$)。此外，腫瘤重量與百分比腫瘤體積具有強相關性($r^2=0.993702$)。該等數據清楚地表明，在FGF19轉基因小鼠中，抗-FGF19 Mab 1A6有效地中和了循環FGF19以便防止腫瘤形成。

因為FGF19當以轉基因形式過表現時可致使體重減輕(Tomlinson等人，Endocrinology. 2002年5月；143(5):1741-7)，故在兩處理組中對小鼠體重進行評估。對小鼠實施每週稱重，並在處理組之間對體重加以比較。在3月齡時，經對照處理的小鼠(平均體重 $27.98\text{克}\pm0.8351$ ； $N=5$)之體重顯著小於經抗-FGF19 mab 1A6處理的小鼠(平均體重 21.32 ± 0.5036 ； $N=6$)($p<0.0001$)。經1A6處理的FGF19 TG小鼠之體重與在一不同實驗中評估的正常FVB野生型小鼠之體重相似(平均體重 33.22 ± 1.838 $N=6$)。該等數據說明，在FGF19轉基因小鼠中，使用抗-FGF19 mab 1A6進行處理有效地消除了由FGF19誘導的體重減輕。

實例 13：在HCT116細胞中，FGF19處理誘導了 β -連環

蛋白之酪胺酸磷酸化並引起了與 β -連環蛋白結合的E-鈣黏蛋白之損失。

在表現FGF19之轉基因小鼠中發現的肝細胞癌具有可顯示與 β -鈣黏蛋白(β -連環蛋白或b-cat)抗體之免疫反應性的瘤形成細胞(Nicoles等人, 上文)。此外, 有人提出, 在多種細胞類型及器官中, Wnt信令在多種細胞進程(包括人類結直腸癌發生)期間可起始或促進FGF信令, 且腫瘤中Wnt及FGF信令途徑之共激活可導致更有害的表現型(參見 refs 7-12, *Cancer Biol & Therapy* 5:9, 1059-64, 2006)。因此, 在人類結腸癌(HCT116)細胞中, 利用FGF19處理、抗-FGF19單株抗體1A6處理、或定向於FGFR4的shRNA擊倒來測試FGF19對Wnt信令途徑的影響或FGF19信令對Wnt信令途徑的抑制。在經處理細胞中用免疫沉澱作用及免疫印跡分析法對 β -連環蛋白酪胺酸磷酸化、 β -連環蛋白-E-鈣黏蛋白結合及活性 β -連環蛋白水平進行評定。

當與經媒劑處理的對照組比較時, 用FGF19(25至100奈克/毫升)對結腸癌細胞(HCT116)之處理提前10分鐘(圖11)導致了 β -連環蛋白酪胺酸磷酸化之顯著增強。已經顯示, β -連環蛋白與鈣黏蛋白結合以形成穩定的細胞-細胞黏著物係藉由 β -連環蛋白酪胺酸磷酸化進行調節。因此, 藉由剝離酪胺酸磷酸化印跡及用抗-E-鈣黏蛋白抗體重新探查酪胺酸磷酸化印跡對經FGF19處理的細胞中E-鈣黏蛋白含量進行評定。結果顯示, 在經FGF19處理的細胞中與 β -連環蛋白結合的E-鈣黏蛋白具有一實質損失。當對E-鈣黏蛋白

實施免疫沉澱並用抗- β -連環蛋白抗體實施免疫印跡分析時獲得了相似的結果。E-鈣黏蛋白結合之減少與在經FGF19處理的細胞中所觀察到之增強的酪胺酸磷酸化水平成反比。

實例 14：使用抗-FGF19抗體 1A6之 FGF19抑制減小了 HCT116細胞中活性 β -連環蛋白含量

先前研究已經證實，Wnt調節的 β -連環蛋白降解對於係癌發生之必需條件(Polakakis等人，Genes Dev 14:1837-51, 2000)且Wnt信號係經由N-末端脫磷酸化的 β -連環蛋白傳送(Staal FJT等人，EMBO Reports 3:63-68, 2002)。使用對在殘基Ser37及Thr41處經脫磷酸化的 β -連環蛋白具有特異性的特異性抗體，檢驗了FGF19或FGF19抑制是否可影響HCT116細胞中之Wnt信令。以任一劑量或在任一時間點用FGF19對HCT116細胞進行處理皆不影響活性 β -連環蛋白水平，表明內源性FGF19可在飽和水平下以自分泌形式激活 β -連環蛋白。然而，當與經對照抗體(gp120)處理的細胞比較時，用抗-FGF19抗體1A6對HCT116細胞進行處理在早在處理後3小時之時間點顯著降低了活性 β -連環蛋白水平，且將降低的活性 β -連環蛋白水平維持了長達24小時($71.8 \pm 1.5\%$ 降低 vs gp120, $p < 0.001$)(圖12)。

實例 15：用抗-FGF19抗體進行處理誘導了Ser33/Ser37/Ser45及Thr41磷酸化

由於FGF19抑制降低了HCT116細胞中之活性 β -連環蛋白水平，隨後評估了用抗-FGF19抗體進行處理是否導致 β -連

環蛋白之N末端Ser-Thr磷酸化及因此而定標 β -連環蛋白以進行泛素化及蛋白酶體降解。當與經蛋白酶體抑制劑加對照抗體(gp120)處理的細胞比較時，先用蛋白酶體抑制劑(MG132, 1 μ M)實施4小時預處理再用抗-FGF19單株抗體1A6實施處理的HCT116細胞顯示了顯著的Ser33/Ser37及Ser45/Thr41磷酸化之增強(圖13)。與經對照抗-gp120抗體處理的細胞相比較，在經抗-FGF19抗體1A6處理的細胞中Ser33/37磷酸化之量化(如藉由計算介於總 β -連環蛋白蛋白及磷酸化蛋白水平之間之比率進行測定)顯示了 $123.4 \pm 7\%$ 增加($p < 0.05$)。同樣地，與經對照抗-gp120抗體處理的細胞相比較，在經抗-FGF19單株抗體1A6處理的細胞中Ser45/T41磷酸化增加了 $166.8 \pm 11\%$ ($p < 0.05$)。

用線性離子阱質譜法對 β -連環蛋白之N末端中的Ser-Thr磷酸化實施進一步分析。在先用一蛋白酶體抑制劑實施預處理再用抗-FGF19抗體1A6或對照抗-gp20抗體處理的細胞中，用線性離子阱質譜測定法對未經磷酸化的 β -連環蛋白肽之信號強度進行測定。將數據對來自經處理或未經處理試樣之顯示無信號強度差別的非相關性多肽(包含全部4個磷酸化位點)實施歸一化。當與自經對照抗-gp120抗體處理之細胞分離的 β -連環蛋白肽相比較時，自經抗-FGF19抗體1A6處理之細胞分離的 β -連環蛋白肽顯示較小的信號強度(圖14)，此清楚地表明在經抗-FGF19單株抗體1A6處理的細胞中在 β -連環蛋白之N末端上具有增強的磷酸化。

實例 16：使用 shRNA 之 FGFR4 表現之減少導致了降低的

β-連環蛋白水平

為確定FGFR4受體之抑制是否模仿由於用抗-FGF19抗體進行治療所引起的FGF19抑制的影響，按上文所述生成表現FGFR4-定向的shRNA及對照EGFP-定向的shRNA的穩定細胞系。表現FGFR4-定向的shRNA的穩定細胞系顯示了FGFR4蛋白質表現之有效降低。當與一表現定向於EGFP之shRNA的對照穩定細胞系相比較時，對來自一表現定向於FGFR4的shRNA之穩定細胞系的細胞溶解產物進行的免疫印跡分析顯示活性β-連環蛋白水平幾乎全部降低(圖15)。

實例 17：用抗-FGF19抗體進行處理降低了結腸癌細胞中Wnt-靶基因轉錄水平

在經抗-FGF19抗體1A6處理的HCT116細胞中用實時PCR對Wnt-靶基因(細胞週期蛋白D1、CD44、E-cad、c-jun)表現水平進行測定。如圖16中所示，用抗-FGF19抗體1A6進行處理在6小時時降低了細胞週期蛋白D1、CD44、E-cad及c-jun mRNA表現水平(當與彼等基因在用對照抗體(抗-gp120)處理之細胞中之表現相比較時)。

【圖式簡單說明】

圖1A及B：繪示小鼠抗-人FGF19單株抗體1A6可變區之胺基酸序列。(A)輕鏈可變區(SEQ ID NO:4)。(B)重鏈可變區(SEQ ID NO:8)。胺基酸係根據Kabat編號。圖中繪示了HVR之位置。

圖2：藉由半定量RT-PCR對取自結腸(A)及肺(B)之正常

及腫瘤試樣中之FGF19及FGFR4 mRNA表現進行評估。用GAPDH表現對各值實施歸一化，並將其與各組織之最小表現試樣實施比較。在結腸腺癌(C)、肺鱗狀細胞癌(D)、及肝細胞癌(E)中，FGF19及FGFR4 RNA探針原位雜交之亮區(左圖)及暗區(右圖)照度及FGF19免疫組織化學(IHC)(下圖)之代表性影像。在肝硬化小瘤(F)中FGF19 RNA探針原位雜交之亮區(頂部左圖)及暗區(頂部右圖)照度及FGF19 IHC(下圖)之代表性影像。

圖3：腫瘤細胞系及異種移植組織中FGF19及FGFR4 mRNA及蛋白質表現。(A) FGF19及FGFR4 mRNA在結腸腫瘤細胞系、Colo205、SW620、及HCT116中具有高度相關性表現。用半定量RT-PCR對FGF19及FGFR4 mRNA表現進行評估。用GAPDH表現對各值實施歸一化，並將其與各基因之最小表現細胞系實施比較。(B)對一組結腸癌細胞系表現的FGF19及FGFR4蛋白實施西方印跡分析。藉由免疫沉澱作用及西方印跡分析證實了結腸癌細胞系中的FGF19蛋白質表現。(C)，(D)在裸鼠中對一結腸癌細胞系之子集實施皮下接種。在3周後，將腫瘤切下並實施處理以便實施FGF19免疫染色。顯示在400X下之代表區圖片(C)及400X再插入600X後之代表區圖片(D)(線段=25微米)。

圖4：FGF19與FGFR4複合物之組份結合。(A)用經微孔吸附的硫酸肝素蛋白糖對FGF19及FGFR4蛋白實施培養。先用生物素化的特異性抗體再用辣根過氧化物酶偶聯的抗

生物素蛋白鏈菌素及比色底物對該結合實施檢測。(B) 用肝素瓊脂糖對FGF19及FGF1蛋白質實施培養，並用1毫升包括多種NaCl濃度之結合緩衝劑對凝膠漿液實施洗滌。剩餘肝素瓊脂糖結合的蛋白用SDS PAGE試樣緩衝液實施洗脫並藉由西方印跡分析法進行分析。對照泳道(內含物)表示凝膠上直接裝載的最初數量的蛋白質。FGF19蛋白質對於捕獲至固相(C)上的或在溶液(D)中的FGFR4具有獨特的結合特異性。(E)在多種葡萄糖胺聚糖(Hep Sulf：硫酸肝素；CS B：硫酸軟骨素B；CS A：硫酸軟骨素A；CS b：硫酸軟骨素C)之存在下，FGF19蛋白與固相捕獲的FGFR4-Fc蛋白質之結合。(F)在多種長度的肝素片段之存在下，FGF19蛋白與固相捕獲的FGFR4 IgG蛋白之結合。(G) 對¹²⁵I-FGF19蛋白與固相捕獲的FGFR4-Fc蛋白質之結合的Scatchard分析。

圖5：抗-FGF19單株抗體1A6抑制了FGF19活體外生物學活性。(A)單株抗體與固相捕獲的FGF19蛋白之結合。(B)在抗-FGF19單株抗體("mab")之存在下，FGF19蛋白質與固相捕獲的FGFR4-Fc蛋白之結合。(C)使用抗-FGF19 mab 1A6之處理抑制了FGF信令途徑之FGF19激活。(D)使用抗-FGF19 mab 1A6之處理抑制了FGF19-誘導的CYP7α1阻抑。在存在或不存在抗體之情況下，用FGF19蛋白質對在無血清培養基中過夜培養的HEPG2細胞實施處理。藉由半定量RT-PCR用基因特異性引物及探針對CYP7α1表現進行評估並將其對GAPDH表現進行歸一化。(E)用抗-FGF19 mab

1A6進行處理抑制了FGF19促進的細胞遷移。用1型膠原對8微米孔隙率24-孔改良的博伊登室之表現實施塗覆。將無血清培養基中之細胞加入上室中。添加了包含FGF19及各種濃度之抗-FGF19 mab 1A6的相同培養基後，對遷移至下室的細胞實施染色及計數。針對每種情況，求一式三份數據的平均值。

圖6：抗-FGF19抗體識別的抗原決定部位之鑑別。用瓊脂糖偶合的抗體對FGF19蛋白實施2小時培養。對樹脂實施洗滌並在37°C下用胰蛋白酶實施消化過夜。對凝膠漿液實施洗滌，並對所結合肽實施洗脫，再藉由MALDI-TOF-MS加以分析。(A)對與瓊脂糖偶合的mab 1A6結合的經胰蛋白酶消化的FGF19之可溶性成份實施的質譜分析。(B)對自瓊脂糖偶合的1A6抗體洗脫的FGF19胰蛋白酶肽實施的質譜分析。(C)對自瓊脂糖偶合1A1抗體洗脫的FGF19胰蛋白酶肽實施的質譜分析。(D)肽與抗-FGF19 mab 1D1對固相捕獲的FGF19之競爭結合。在代表許多FGF19蛋白質部分之肽的存在下，用捕獲至經鍍塗覆培養板上的FGF19-His對抗-FGF19 mab 1D1實施培養。用HRP-偶聯的抗-小鼠IgG及發色底物對抗體結合力實施檢測。(E)將1A6抗原決定部位(用一箭頭指示)描繪至FGF19-FGFR4相互作用模型上。將FGFR4表面表示為一球形，其中將FGF19表示為一條帶。

圖7：用抗-FGF19小鼠單株抗體1A6進行處理抑制了活體內結腸腫瘤生長。用 5×10^6 HCT1126或Colo201細胞對無

胸腺小鼠實施經皮下接種。將帶有經確定的等容積(約100毫米³)腫瘤之小鼠隨機分組，並用抗-FGF19 mab 1A6或一對照抗體每週兩次實施腹膜腔內處理。結果以平均腫瘤體積 $\pm$ sem之形式給出。在該等研究結束時，自抗-FGF19 mab 1A6處理的或對照抗體處理的小鼠切下HCT116異種移植腫瘤及Colo201異種移植腫瘤，實施均質化，並藉由西方印跡分析法關於FGFR4、FRS2、ERK及 β -連環蛋白激活對其實施分析。(A)與用對照抗體進行處理相比較，用抗-FGF19 mab 1A6進行處理對HCT116結腸腫瘤異種移植物之生長實施抑制。(B)在用抗-FGF19 mab 1A6處理的HCT116異種移植腫瘤中對FGFR4、FRS2、及ERK之磷酸化、及 β -連環蛋白激活實施抑制。(C)與用對照抗體之處理相比較，藉由利用抗-FGF19 mab 1A6之處理對Colo201結腸腫瘤異種移植物之生長實施抑制。(D)在用抗-FGF19 mab 1A6處理的Colo201異種移植腫瘤中，FGFR4、FRS2、及ERK磷酸化、及 β -連環蛋白激活受到抑制。對於(A)及(C)，箭頭表示實施處理。結果以平均腫瘤體積 $\pm$ SE之形式給出。

圖8：抗體抗原決定部位序列測定。使用抗原決定部位切割程序對分離的肽實施碰撞誘導解離及人工測序。(A)包含抗-FGF19 mab 1A6之抗原決定部位的肽序列(SEQ ID NO:9)。(B)包含抗-FGF19 mab 1A1之抗原決定部位的肽序列(SEQ ID NO:10)。

圖9：在一FGF19-轉基因肝細胞癌動物模型中用抗-

FGF19小鼠單株抗體1A6進行處理抑制了活體內肝細胞癌。用對照抗體或抗-FGF19 mab 1A6對FGF19轉基因小鼠實施處理，採集肝臟實施肉眼評估(A)。使用強化正常肝細胞之碘化甘油三酯的顯微CT分析顯示，與用抗-FGF19 mab 1A6處理的肝相比較，用對照抗體處理的肝具有增大的未強化腫瘤體積(B)。

圖10：用FGF19蛋白進行的處理促進了HCT116細胞遷移。用1型膠原對8微米孔隙率24-孔改良的博伊登室之表面實施塗覆。將無血清培養基中之HCT116細胞加入上室中。將下室充滿包含多種濃度之FGF19的相同培養基，並在37°C下對該等板實施培養。第二天，對遷移至插片下側的細胞實施染色，並在顯微鏡下進行計數。針對每種情況，求一式三份數據的平均值。

圖11：在結腸癌細胞系HCT116中，用FGF19進行處理誘導了 β -連環蛋白酪胺酸磷酸化並引起了與 β -連環蛋白結合的E-鈣黏蛋白之損失。以25及100奈克/毫升用媒劑("veh")(對照)或FGF19對未供給血清的結腸癌細胞實施10分鐘處理。藉由免疫沉澱作用("IP")及免疫印跡法("WB")對 β -連環蛋白之酪胺酸磷酸化進行測定。將相同印跡剝離，用一抗-E-鈣黏蛋白抗體實施再次探測，並隨後用抗- β -連環蛋白抗體對總 β -連環蛋白實施再次探測。將三次獨立實驗之代表性印跡示出。對 β -連環蛋白磷酸化實施定量分析，並藉由計算自三次獨立實驗得到的磷酸化E-鈣黏蛋白與總 β -連環蛋白含量之間的比率來確定與E-鈣黏蛋白結

合的 β -連環蛋白(平均值 $\pm$ SE)。

圖 12A 及 B：用抗-FGF19 抗體處理降低了 HCT116 細胞中活性 β -連環蛋白含量。在血清存在下對細胞實施培養，並用對照(gp120)或抗-FGF19 mab 1A6(皆係 20 微克/毫升)以不同時間間隔實施處理。(A)藉由免疫印跡法對活性 β -連環蛋白("act- β -cat")含量(N-末端脫磷酸化 β -連環蛋白)進行測定。將相同印跡剝離，並對總 β -連環蛋白(" β -cat")含量實施再次探測。將三次獨立實驗之代表性印跡示出。(B)在處理後 24 小時時對活性 β -連環蛋白含量(藉由計算自三次獨立實驗獲得的活性 β -連環蛋白與總 β -連環蛋白含量之間的比率所確定(平均值 $\pm$ SE))實施的定量分析。作為一對照對 β -肌動蛋白含量進行測定。

圖 13：用抗-FGF19 抗體進行處理誘導了 HCT116 細胞中 β -連環蛋白胺基酸殘基 Ser33/Ser37/Ser45 及 Thr41 上之磷酸化。在血清存在下對細胞實施培養，先用 MG132(1 μ M)實施 4 小時處理，再用對照(gp120)或抗-FGF19 (1A6)抗體(皆係 20 微克/毫升)實施 24 小時處理。藉由免疫印跡法對 Ser33/S37/S45 及 Thr41 上的 β -連環蛋白磷酸化實施分析。將相同印跡剝離，並關於總 β -連環蛋白對其實施再次探測。將三次獨立實驗之代表性印跡示出。作為一對照對 β -肌動蛋白含量進行測定。

圖 14：用 FGFR4 定向的 shRNA 進行處理抑制了 HCT116 細胞中 FGFR4 蛋白質及活性 β -連環蛋白之表現。藉由設計並選殖 shRNA 序列至一逆轉錄病毒誘導性表現載體系統中，

構建FGFR4組合式載體。對cDNA實施轉染，並在HCT116細胞中用嘌呤黴素選擇法生成表現siRNA的穩定細胞系。用或不用強力黴素(Dox)對包含對照shRNA及FGFR4-定向的shRNA之穩定細胞系實施處理，並藉由免疫沉澱作用及免疫印跡法對FGFR4蛋白質及活性 β -連環蛋白含量進行測定。將三次獨立實驗之代表性印跡示出。

圖 15：用線性離子阱質譜法對N末端 β -連環蛋白磷酸化水平實施間接定量。如實例中所闡述使用線性離子阱儀器對來自先用MG132處理再用對照抗體(gp120)或抗-FGF19 mab 1A6處理之細胞的經免疫沉澱之 β -連環蛋白的N末端肽實施數據依賴性串列質譜。生成針對各CID頻譜之交互相關分數，並測定肽的相對豐度。將數據對顯示與經處理及未經處理試樣無信號強度差異之其他非相關肽之信號密度實施歸一化。

圖 16：用抗-FGF19抗體進行處理降低了結腸癌細胞中Wnt-靶基因轉錄水平。在血清存在下對HCT116細胞實施培養，並用對照抗體(gp120)或1A6抗體(20微克/毫升)實施6小時處理。藉由TAQMan分析法對 β -連環蛋白靶基因(細胞週期蛋白D1、CD44、E-鈣黏蛋白及c-jun)表現水平實施分析。用序列檢測器1.6.3(PE Applied Biosystems)實施數據分析，並將結果對RPL19基因表現水平實施歸一化。

[部分參考文獻目錄]

Anthony, P.P. (1979). J Toxicol Environ Health., 5, 301-13.

Bange, J., Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Haring, H.U., Knayzev, P., Iacobelli, S., Hofler, H. & Ullrich, A. (2002). *Cancer Res*, 62, 840-7.

Burgess, W.H. & Maciag, T. (1989). *Annu Rev Biochem.*, 58, 575-606.

Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. & Radvanyi, F. (1999). *Nat Genet*, 23, 18-20.

Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (2001). *Blood*, 97, 729-36.

Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (1997). *Nat Genet.*, 16, 260-4.

Dorkin, T.J., Robinson, M.C., Marsh, C., Bjartell, A., Neal, D.E. & Leung, H.Y. (1999). *Oncogene*, 18, 2755-61.

Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. (2005). *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, 139-49. Epub 2005 Feb 1.

Gowardhan, B., Douglas, D.A., Mathers, M.E., McKie, A.B., McCracken, S.R., Robson, C.N. & Leung, H.Y. (2005). *Br J Cancer*, 92, 320-7.

Harmer, N.J., Pellegrini, L., Chirgadze, D., Fernandez-

Recio, J. & Blundell, T.L. (2004). *Biochemistry*, 43, 629-40.

Holcomb, I.N., Kabakoff, R.C., Chan, B., Baker, T.W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H.B., Wright, B.D., Skelton, N.J., Frantz, G.D., Tumas, D.B., Peale, F.V., Jr., Shelton, D.L. & Hebert, C.C. (2000). *Embo J*, 19, 4046-55.

Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang da, Y., Mansfield, T.A., Kliwer, S.A., Goodwin, B. & Jones, S.A. (2003). *Genes Dev.*, 17, 1581-91. Epub 2003 Jun 18.

Holzmann, K., Kohlhammer, H., Schwaenen, C., Wessendorf, S., Kestler, H.A., Schwoerer, A., Rau, B., Radlwimmer, B., Dohner, H., Lichter, P., Gress, T. & Bentz, M. (2004). *Cancer Res*, 64, 4428-33.

Huang, Y.Q., Li, J.J., Nicolaides, A., Zhang, W.G. & Friedman-Kien, A.E. (1993). *Anticancer Res.*, 13, 887-90.

Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P. & Nevanlinna, H. (1993). *Int J Cancer.*, 54, 378-82.

Jang, J.H., Shin, K.H. & Park, J.G. (2001). *Cancer Res*, 61, 3541-3.

Jang, J.H., Shin, K.H., Park, Y.J., Lee, R.J., McKeehan, W.L. & Park, J.G. (2000). *Cancer Res*, 60, 4049-52.

Jeffers, M., LaRoche, W.J. & Lichenstein, H.S. (2002).
Expert Opin Ther Targets, 6, 469-82.

Kan, M., Wu, X., Wang, F. & McKeehan, W.L. (1999). J
Biol Chem, 274, 15947-52.

Kiuru-Kuhlefelt, S., Sarlomo-Rikala, M., Larramendy,
M.L., Soderlund, M., Hedman, K., Miettinen, M. &
Knuutila, S. (2000). Mod Pathol., 13, 433-7.

Kobayashi, M., Ikeda, K., Hosaka, T., Sezaki, H.,
Someya, T., Akuta, N., Suzuki, F., Suzuki, Y., Saitoh, S.,
Arase, Y. & Kumada, H. (2006). Cancer., 106, 636-47.

Krejci, P., Dvorakova, D., Krahulcova, E., Pachernik, J.,
Mayer, J., Hampl, A. & Dvorak, P. (2001). Leukemia, 15,
228-37.

Lee, F.T., Jr., Chosy, S.G., Naidu, S.G., Goldfarb, S.,
Weichert, J.P., Bakan, D.A., Kuhlman, J.E., Tambeaux, R.H.
& Sproat, I.A. (1997). Radiology., 203, 465-70.

Liscia, D.S., Merlo, G.R., Garrett, C., French, D.,
Mariani-Costantini, R. & Callahan, R. (1989). Oncogene, 4,
1219-24.

Marsh, S.K., Bansal, G.S., Zammit, C., Barnard, R.,
Coope, R., Roberts-Clarke, D., Gomm, J.J., Coombes, R.C.
& Johnston, C.L. (1999). Oncogene, 18, 1053-60.

Mattila, M.M., Ruohola, J.K., Valve, E.M., Tasanen,
M.J., Seppanen, J.A. & Harkonen, P.L. (2001). Oncogene,

20, 2791-804.

Mauad, T.H., van Nieuwkerk, C.M., Dingemans, K.P., Smit, J.J., Schinkel, A.H., Notenboom, R.G., van den Bergh Weerman, M.A., Verkruijsen, R.P., Groen, A.K., Oude Elferink, R.P. & 等人 (1994). *Am J Pathol*, 145, 1237-45.

Morimoto, Y., Ozaki, T., Ouchida, M., Umehara, N., Ohata, N., Yoshida, A., Shimizu, K. & Inoue, H. (2003). *Cancer*, 98, 2245-50.

Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E., Hillan, K., Wright, B., Frantz, G.D., Pham, T.A., Dillard-Telm, L., Tsai, S.P., Stephan, J.P., Stinson, J., Stewart, T. & French, D.M. (2002). *Am J Pathol*, 160, 2295-307.

Ornitz, D.M. & Itoh, N. (2001). *Genome Biol*, 2, REVIEWS3005.

Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G. & Goldfarb, M. (1996). *J Biol Chem.*, 271, 15292-7.

Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R. & Mohammadi, M. (1999). *Cell.*, 98, 641-50.

Popovici, C., Zhang, B., Gregoire, M.J., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D. & Pebusque, M.J. (1999). *Blood.*, 93, 1381-9.

Powers, C.J., McLeskey, S.W. & Wellstein, A. (2000). *Endocr Relat Cancer*, 7, 165-97.

Qian, Z.R., Sano, T., Asa, S.L., Yamada, S., Horiguchi, H., Tashiro, T., Li, C.C., Hirokawa, M., Kovacs, K. & Ezzat, S. (2004). *J Clin Endocrinol Metab.*, 89, 1904-11.

Richelda, R., Ronchetti, D., Baldini, L., Cro, L., Viggiano, L., Marzella, R., Rocchi, M., Otsuki, T., Lombardi, L., Maiolo, A.T. & Neri, A. (1997). *Blood.*, 90, 4062-70.

Ruohola, J.K., Viitanen, T.P., Valve, E.M., Seppanen, J.A., Loponen, N.T., Keskitalo, J.J., Lakkakorpi, P.T. & Harkonen, P.L. (2001). *Cancer Res*, 61, 4229-37.

Schlessinger, J. (2004). *Science.*, 306, 1506-7.

Shimokawa, T., Furukawa, Y., Sakai, M., Li, M., Miwa, N., Lin, Y.M. & Nakamura, Y. (2003). *Cancer Res*, 63, 6116-20.

Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D. & Murison, J.G. (2001). *Gene.*, 271, 171-82.

Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W. & Ullrich, A. (2004). *Int J Cancer*, 111, 213-7.

Wang, J., Stockton, D.W. & Ittmann, M. (2004). *Clin Cancer Res.*, 10, 6169-78.

Weichert, J.P., Longino, M.A., Spigarelli, M.G., Lee, F.T., Jr., Schwendner, S.W. & Counsell, R.E. (1996). *Acad Radiol.*, 3, 412-7.

Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J. & Fletcher, J.A. (1998). *Nat Genet.*, 18, 84-7.

Xie, M.H., Holcomb, I., Deuel, B., Dowd, P., Huang, A., Vagts, A., Foster, J., Liang, J., Brush, J., Gu, Q., Hillan, K., Goddard, A. & Gurney, A.L. (1999). *Cytokine*, 11, 729-35.

Yamada, S.M., Yamada, S., Hayashi, Y., Takahashi, H., Teramoto, A. & Matsumoto, K. (2002). *Neurol Res.*, 24, 244-8.

Yu, C., Wang, F., Jin, C., Huang, X. & McKeehan, W.L. (2005). *J Biol Chem.*, 280, 17707-14. Epub 2005 Mar 4.

Zaharieva, B.M., Simon, R., Diener, P.A., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knonagel, H., Rist, M., Wilber, K., Hering, F., Schonenberger, A., Flury, R., Jager, P., Fehr, J.L., Mihatsch, M.J., Gasser, T., Sauter, G. & Toncheva, D.I. (2003). *J Pathol*, 201, 603-8.

儘管為清楚理解之目的已藉助說明及實例對本發明進行了詳細闡述，但不應將該等闡述及實例理解為對本發明範圍加以限制。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗 FGF19 抗体及其使用方法

<130> P2298R1

<140> 096104900

<141> 2007-02-09

<150> US 60/772,310

<151> 2006-02-10

<150> US 60/780,608

<151> 2006-03-09

<150> US 60/885,866

<151> 2007-01-19

<160> 46

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Phe Leu Ser
5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Val Thr Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn
20 25 30

Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln
80 85 90

Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5
Thr Tyr Gly Val His
5

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6
Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
1 5 10 15

Ser

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7
Lys Glu Tyr Ala Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser
1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

Thr Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn
50 55 60

Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys
65 70 75

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Leu Ala Asn Asp Thr
80 85 90

Ala Ile Tyr Phe Cys Val Arg Lys Glu Tyr Ala Asn Leu Tyr Ala
95 100 105

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ala
110 115

<210> 9
<211> 23
<212> PRT
<213> 人類

<400> 9
Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val
1 5 10 15

Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg
20

<210> 10

<211> 29
 <212> PRT
 <213> 人類
 <400> 10
 His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser
 1 5 10 15
 Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg
 20 25

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 11
 ccatgatgca aaacctccaa t 21

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 12
 acccagacag cgctcttga 20

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 13
 tgcatagaga cctccgggcc ttcc 24

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 14
 aatttgccgt gaggaggatc 20

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 15
 cagtggaaca gaggagattg t 21

<210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 16

ccatcaacga ccccttcatt gacctc 26

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 17
agaccccaag tcttgtcaat aac 23

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 18
aatatcatgt tggaaaacca agtg 24

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 19
ccgctgcttc cacacagcaa 20

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 20
gctcttgacg ggagcatt 18

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 21
cgccatttgc tcctgttt 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 22
gcaggcttcc agcttctc 18

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 23
 agcggattct catggaaca 19

 <210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列

 <400> 24
 ctggtcagcc aggagctt 18

 <210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列

 <400> 25
 tccacaagct gaaggcagac aagg 24

 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列

 <400> 26
 gctgcicctg gtgaacaagc 20

 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列

 <400> 27
 tgttcaatga aatcgtgcgg 20

 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列

 <400> 28
 caagtggaaac ctggccgcaa tgac 24

 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列

 <400> 29
 gaaaaatggt cgctacagca tct 23

 <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 30
ggigctatlg aaagccttgc a 21

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 31
cggacggagg ccgctgacc 19

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 32
gacttgagcc agctgcacag 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 33
gttgggtgcaa cgtcgttacg 20

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 34
cctggacgct cggcctgaag tg 22

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 35
cgttaacagt ggggtccaac t 21

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>合成序列

<400> 36
cccgaagggtc tctcttcaaa 20

<210> 37
<211> 24
<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

<400> 37

atgctaacgc agcagttgca aaca 24

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

<400> 38

agcggattct catggaaca 19

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

<400> 39

ctggtcagcc aggagctt 18

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

<400> 40

tccacaagct gaaggcagac aagg 24

<210> 41

<211> 65

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

<400> 41

gaicccccct cgtgagtcia gatctattca agagatagat ctgactcac 50

gaggtttttt ggaaa 65

<210> 42

<211> 65

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

<400> 42

agcttttcca aaaaacctcg tgagtctaga tctatctctt gaatagatct 50

agactcacga ggggg 65

<210> 43

<211> 65

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>合成序列

```

<400> 43
gatccccgaa ccgcattgga ggcattatca agagaaatgc ctccaatgcg 50
gttccttttt ggaaa 65

<210> 44
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 44
agcttttcca aaaaagaacc gcattggagg catttcctct gataatgcct 50
ccaatgcggt lcggg 65

<210> 45
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 45
gatccccgca gcacgacttc ttcaagtcca agagactlga agaagtcgtg 50
ctgccttttt ggaaa 65

<210> 46
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 46
agcttttcca aaaaagcagc acgacttctt caagtctctt gaacttgaag 50
aagtcgtgct gcggg 65

```

五、中文發明摘要：

本發明提供抗-FGF19抗體、及包含該等抗體之組合物及使用該等抗體之方法、使用抗-FGF19抗體之方法、及包括檢測FGF19及/或FGFR4之方法。

六、英文發明摘要：

VL 序列

uu1A6 E D M G I Y Y C L Q Y D E F P L T F G A G T K V E I K R R

圖 1A

VH 序列

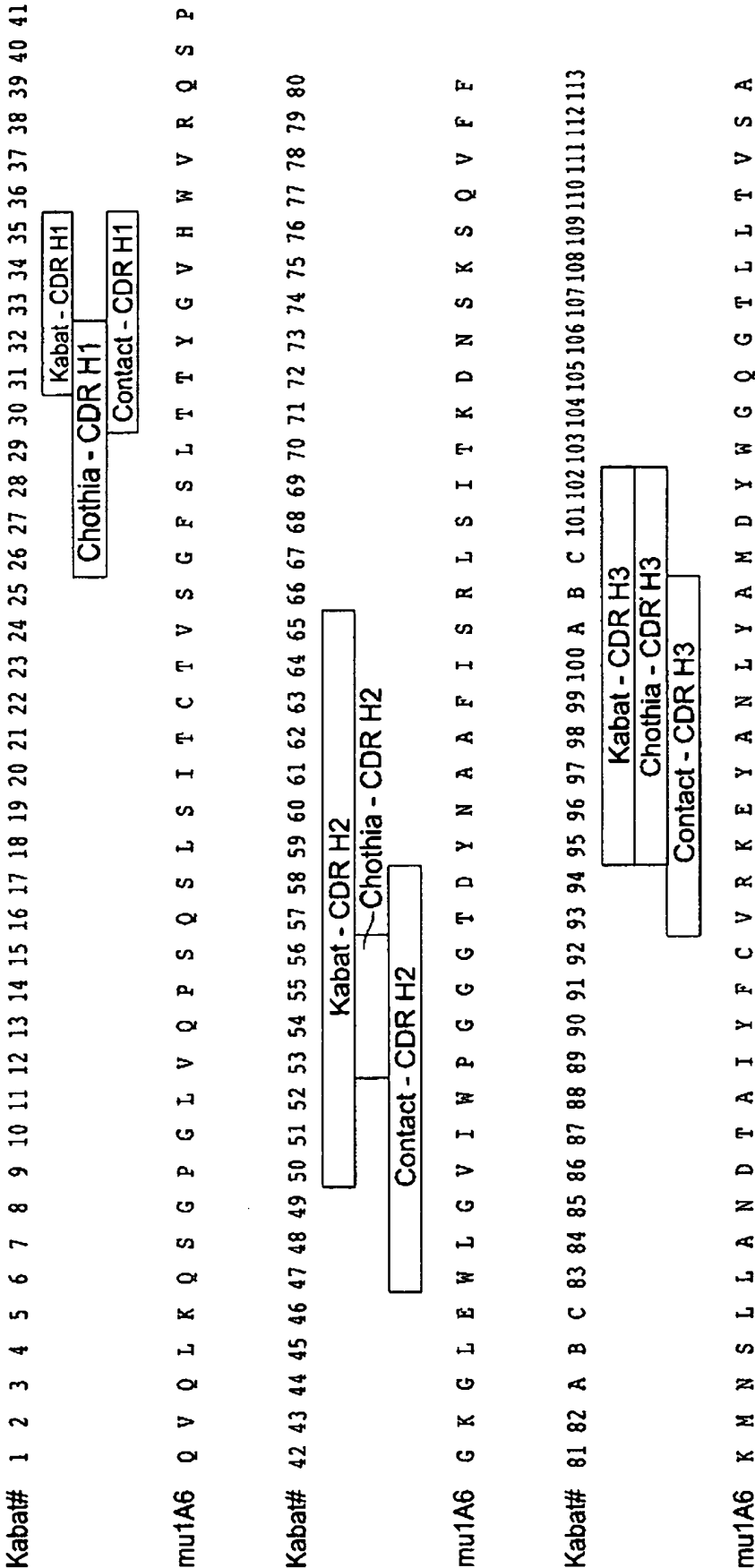


圖 1B

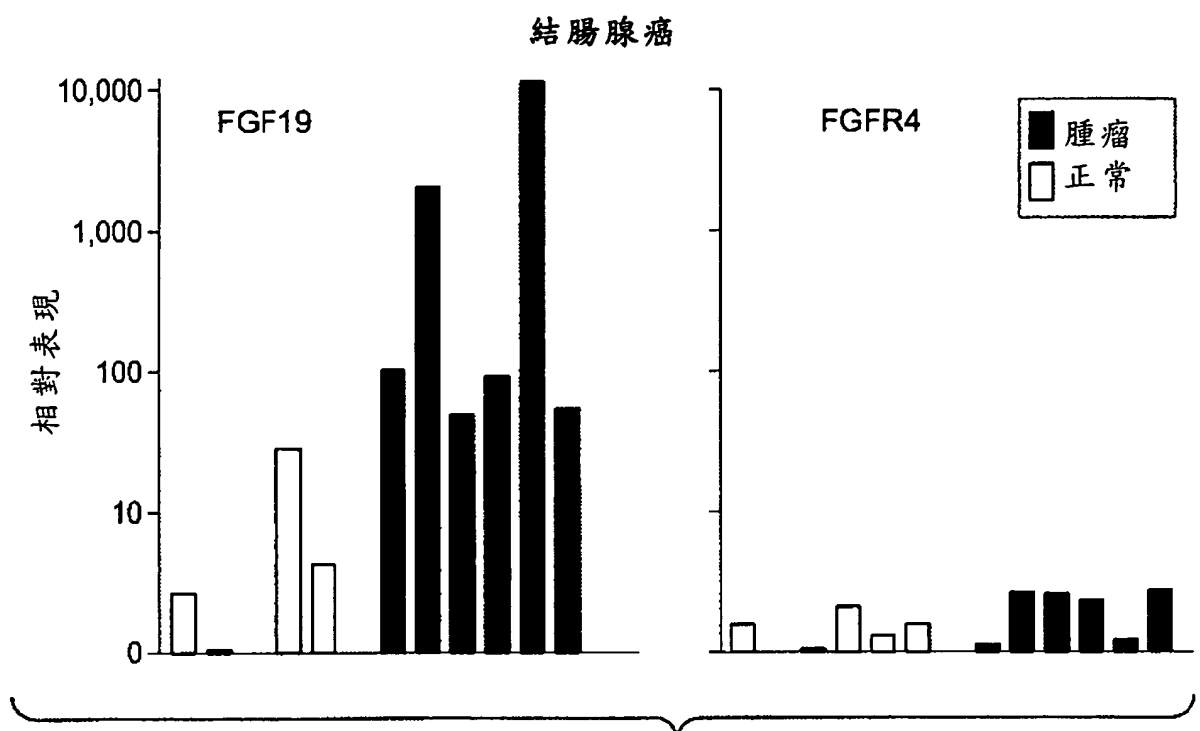


圖 2A

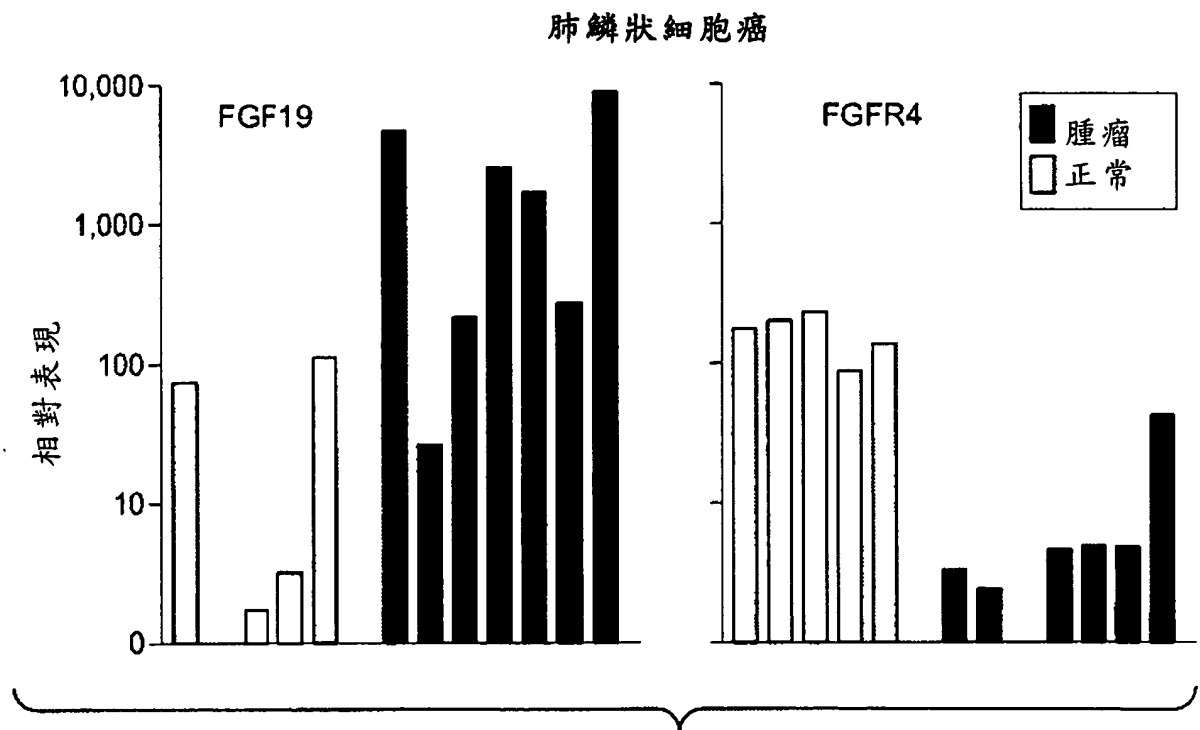


圖 2B

結腸腺癌

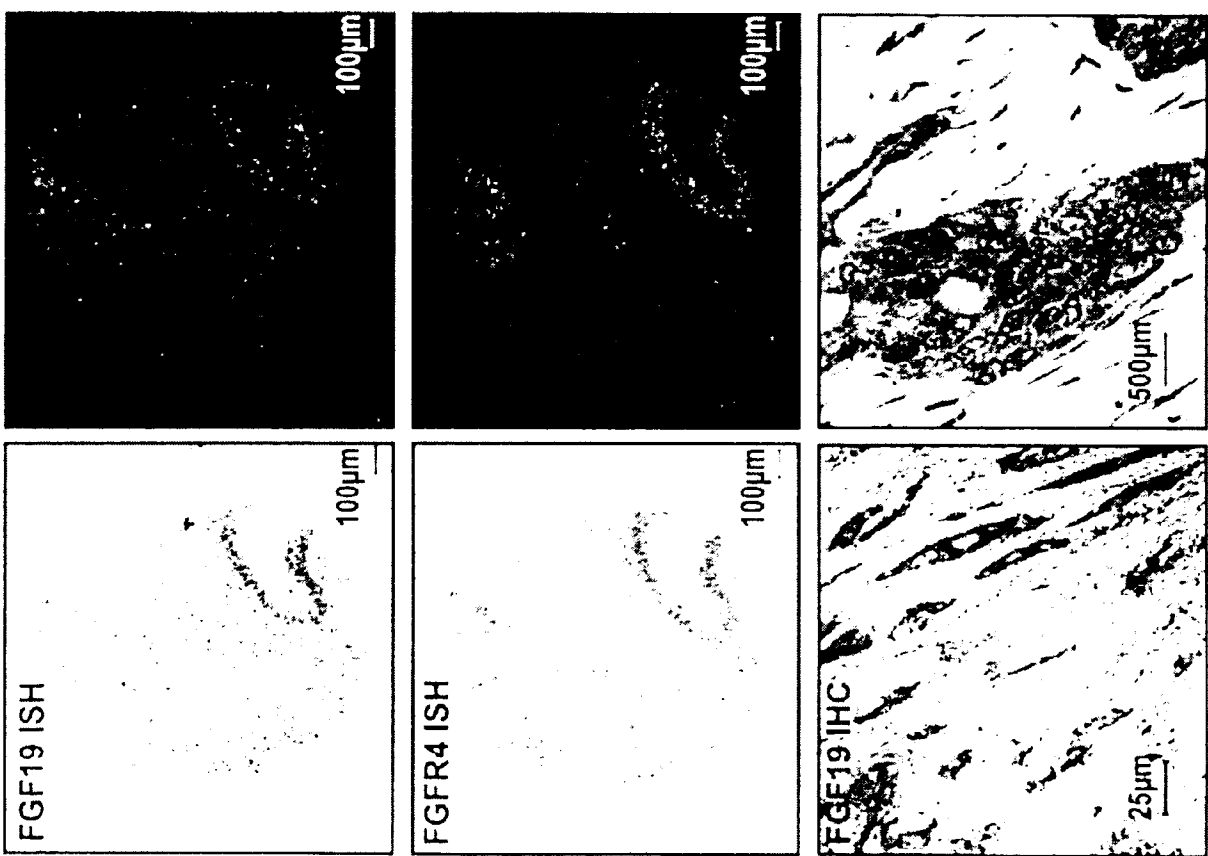


圖 2C

肺鱗狀細胞癌

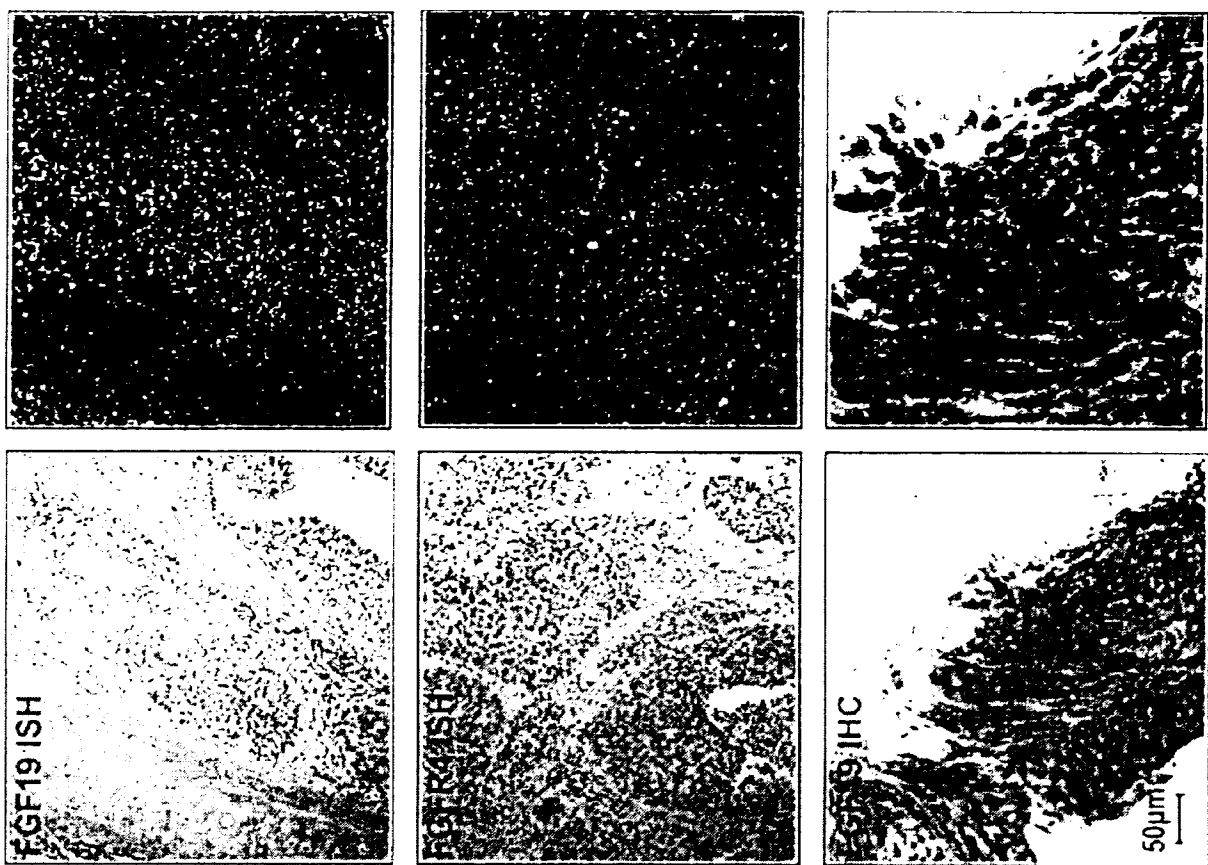


圖 2D

肝細胞癌

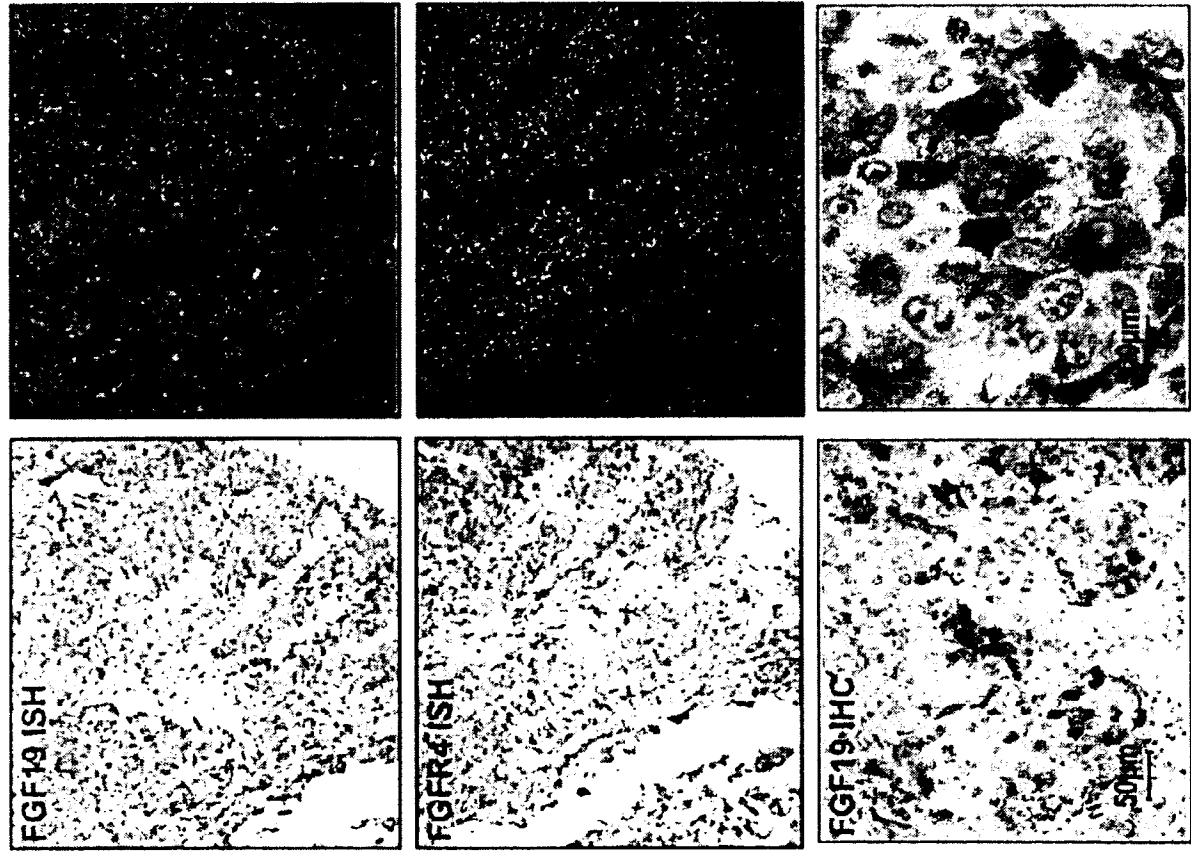


圖 2E

肝破化

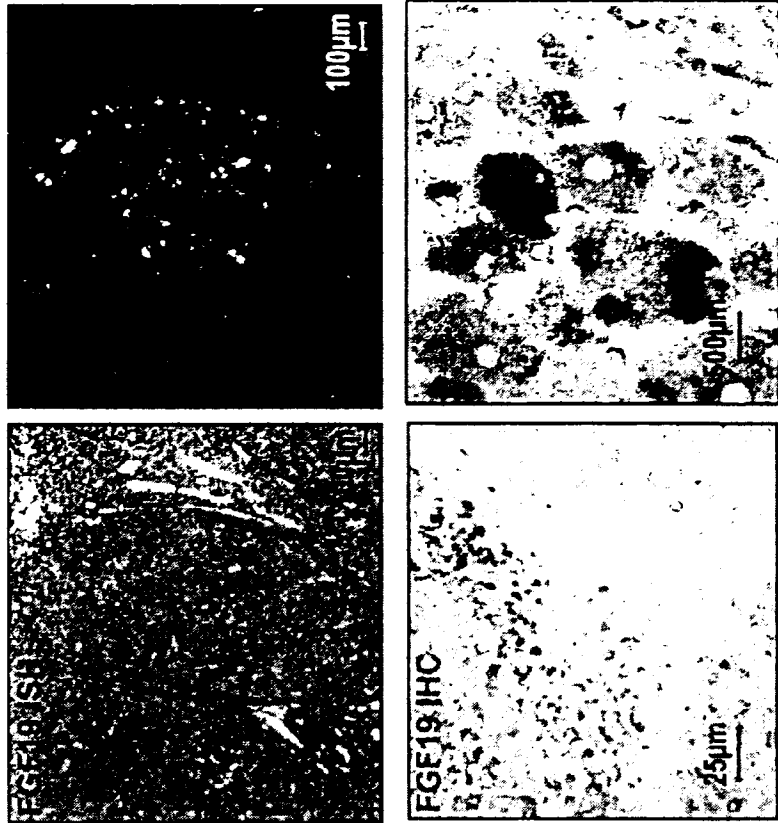


圖 2F

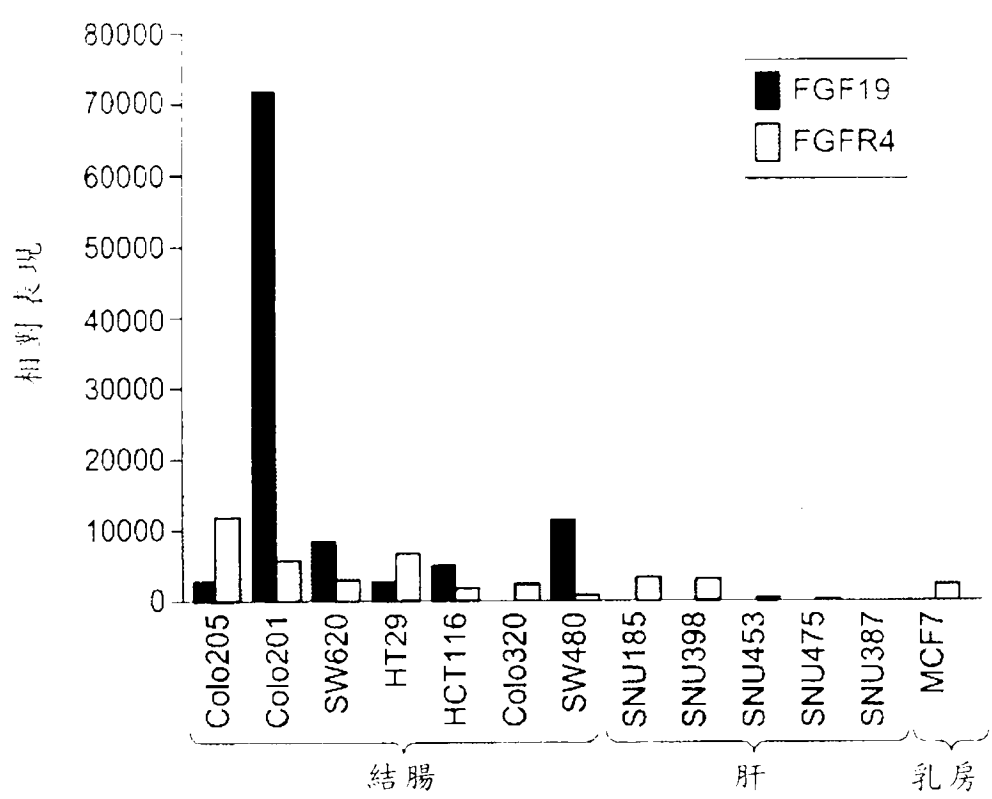


圖3A

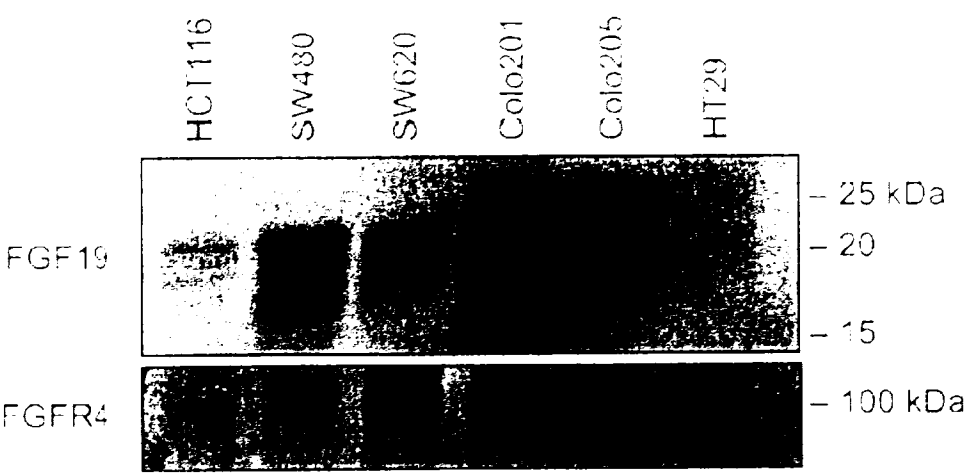


圖 3B

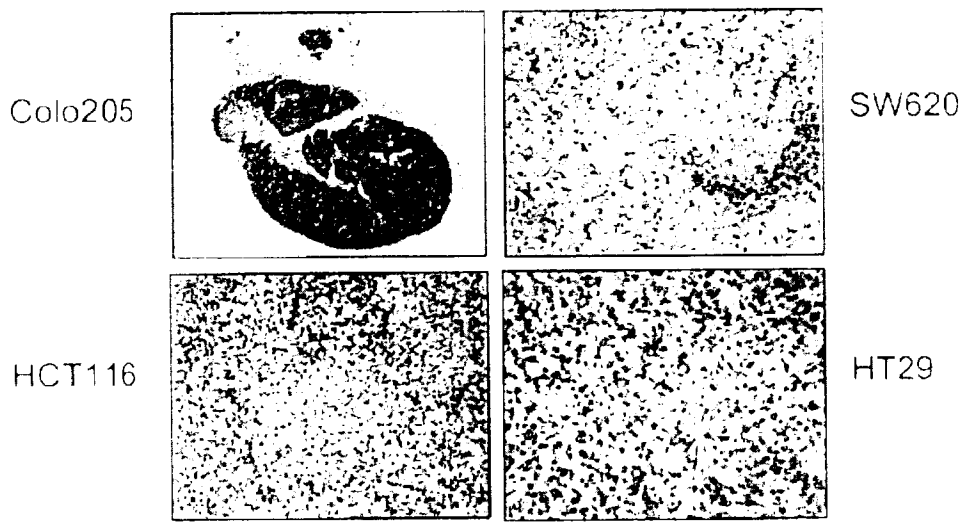


圖 3C

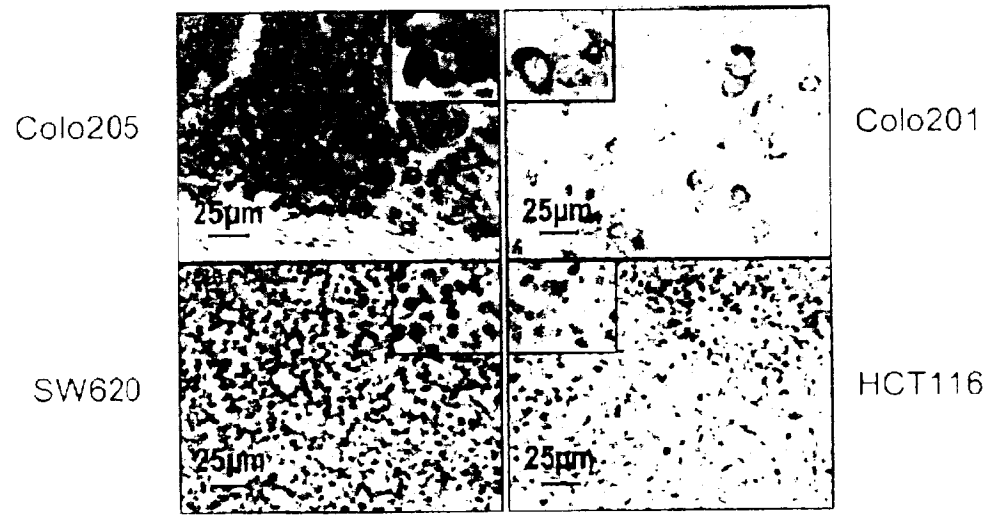


圖 3D

HSPG 結合

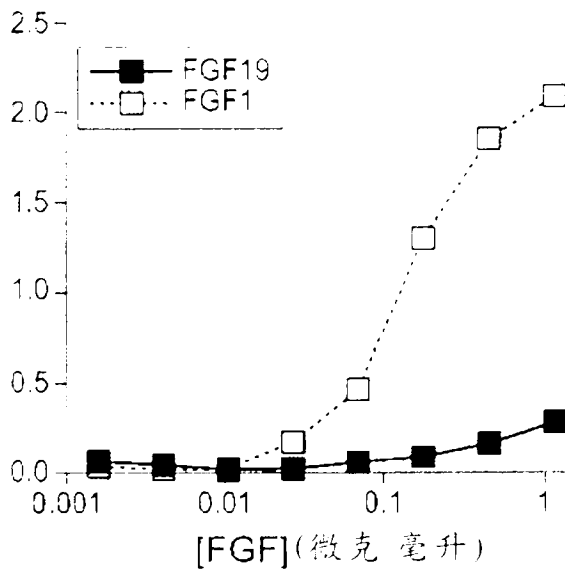


圖 4A

結合
(O.D.450 奈米)

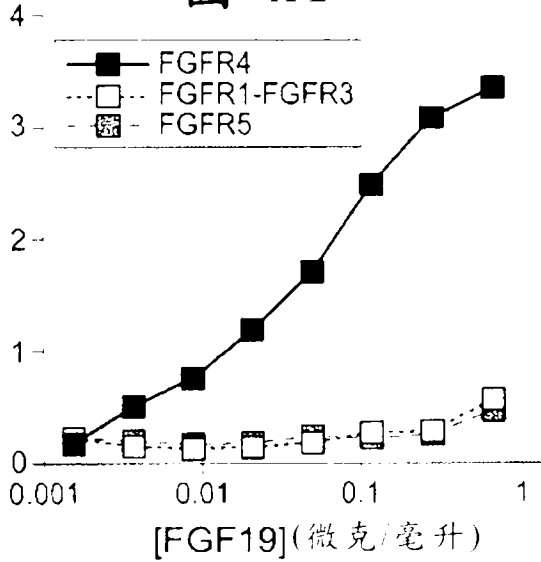


圖 4C

結合
(O.D.450 奈米)

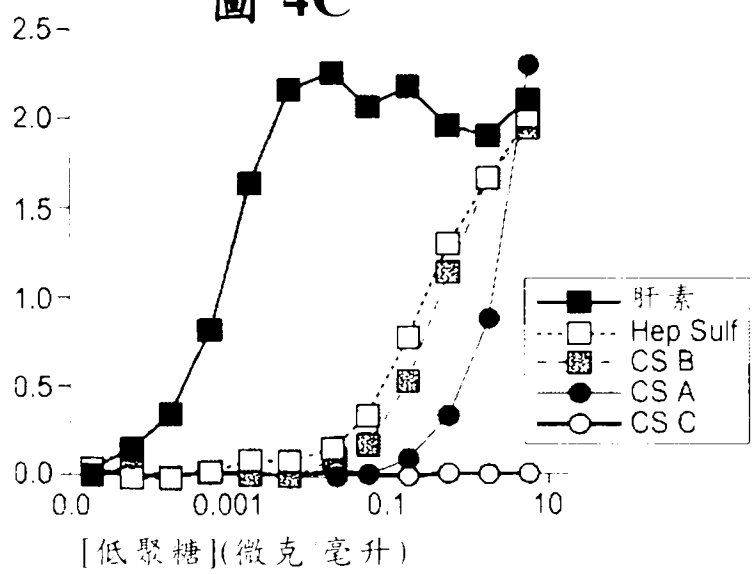


圖 4E

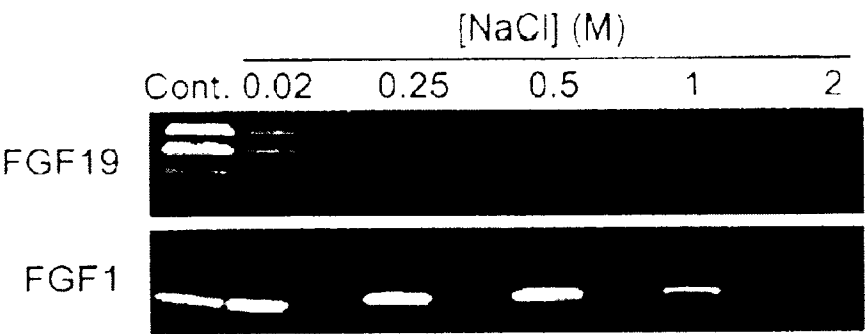


圖 4B

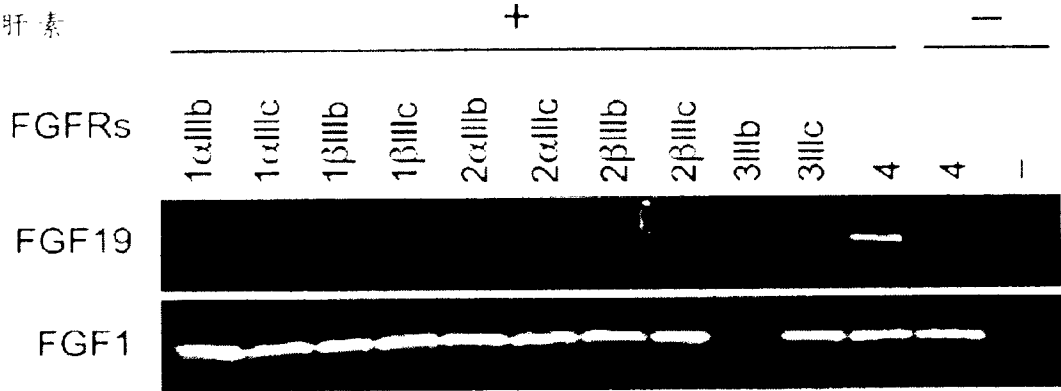


圖 4D

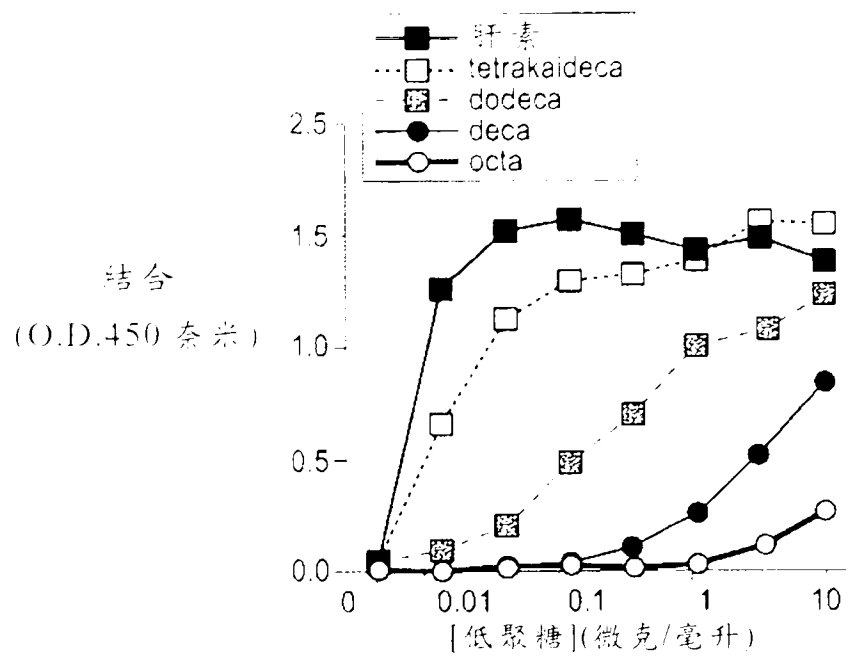


圖 4F

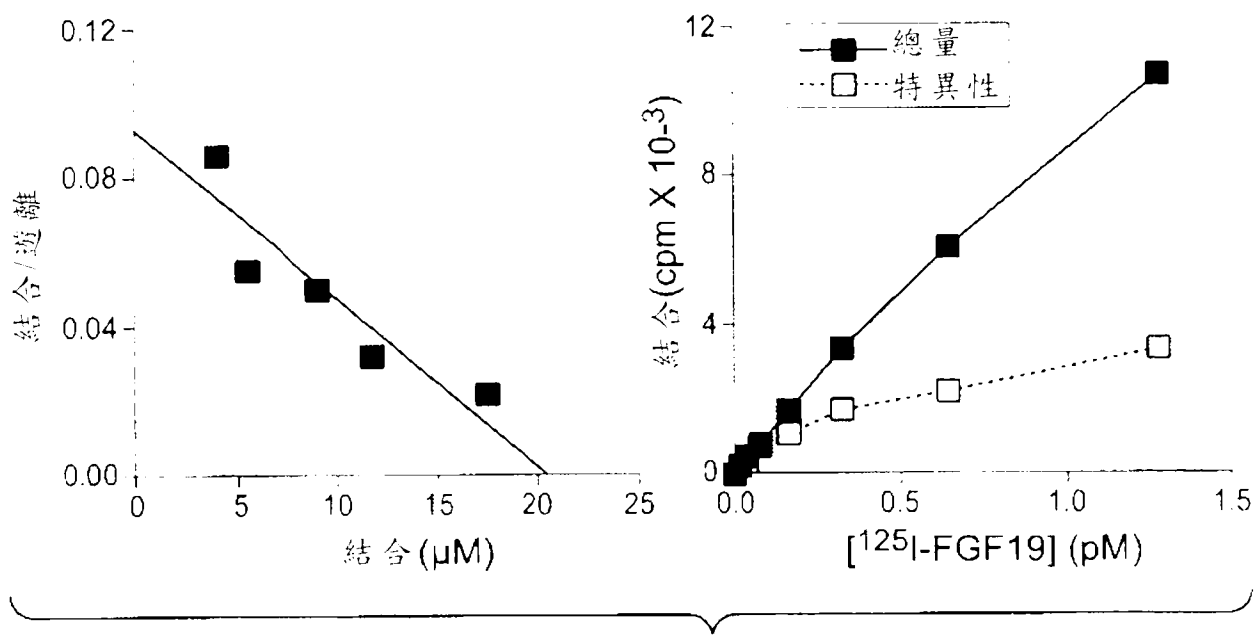


圖 4G

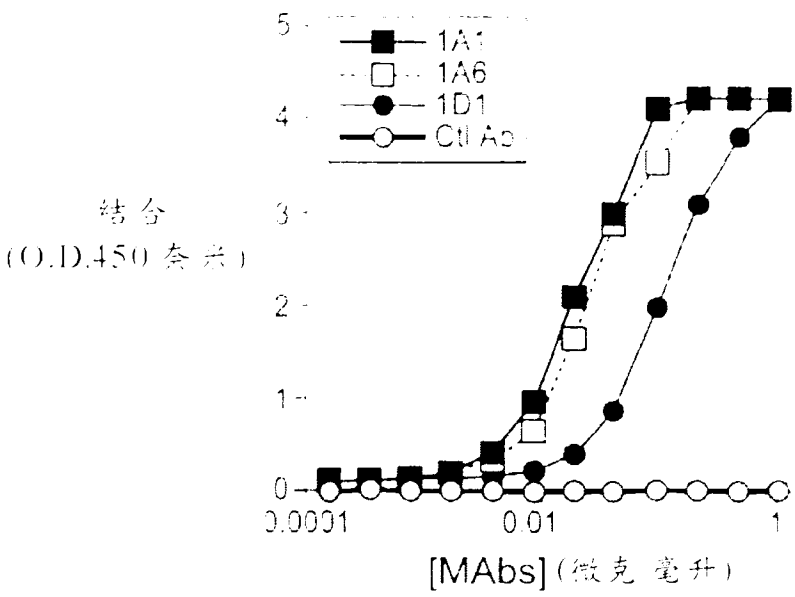


圖 5A

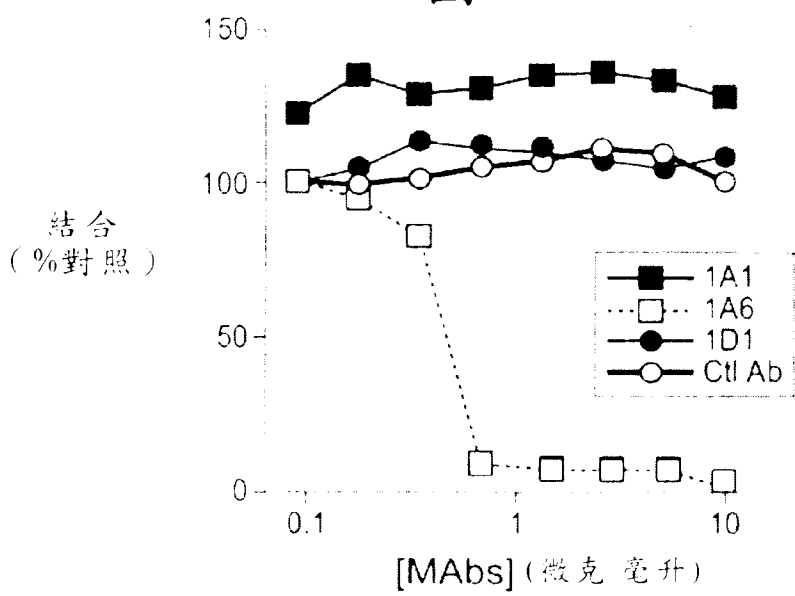


圖 5B

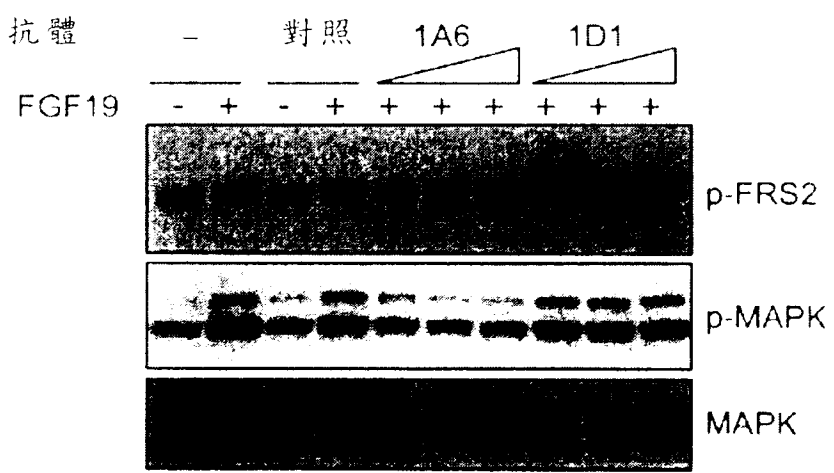


圖 5C

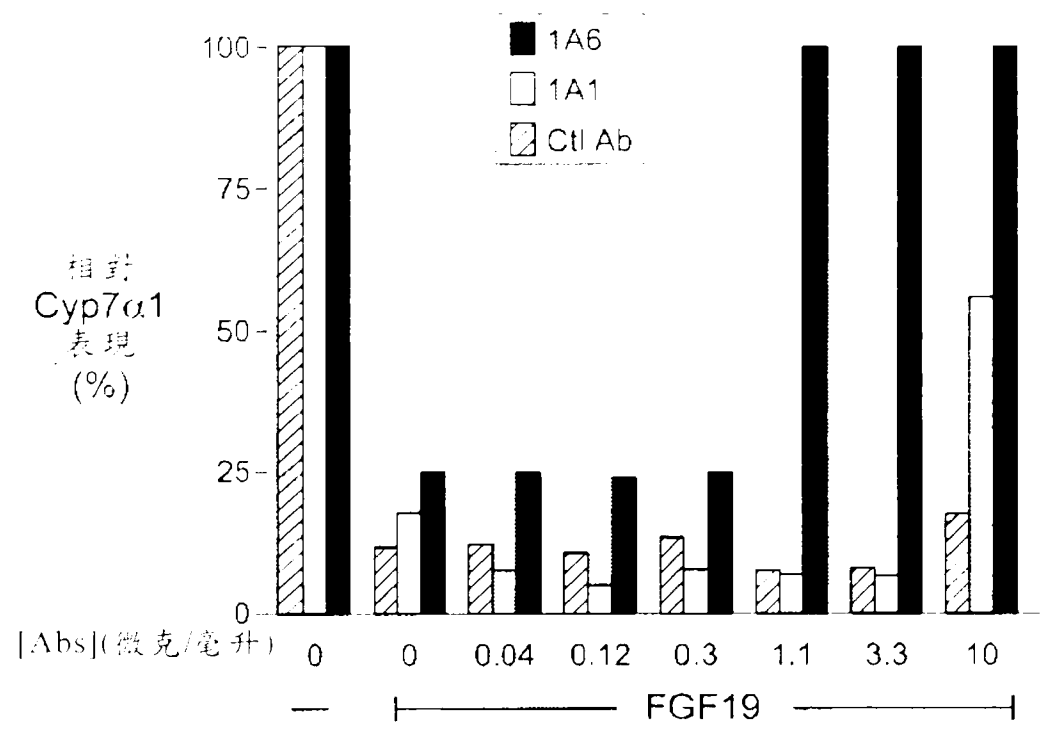


圖 5D

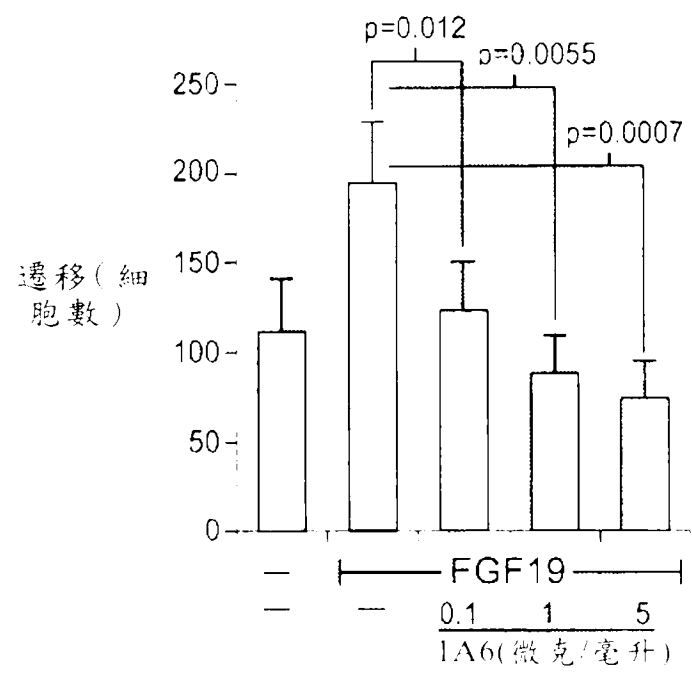


圖 5E

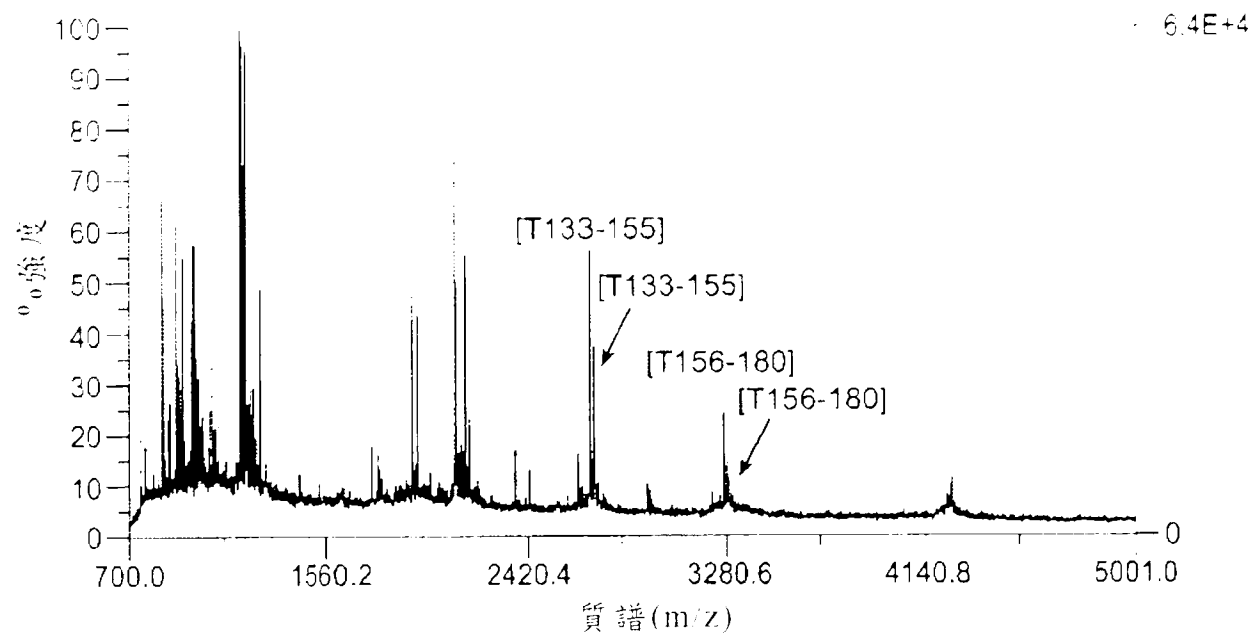


圖 6A

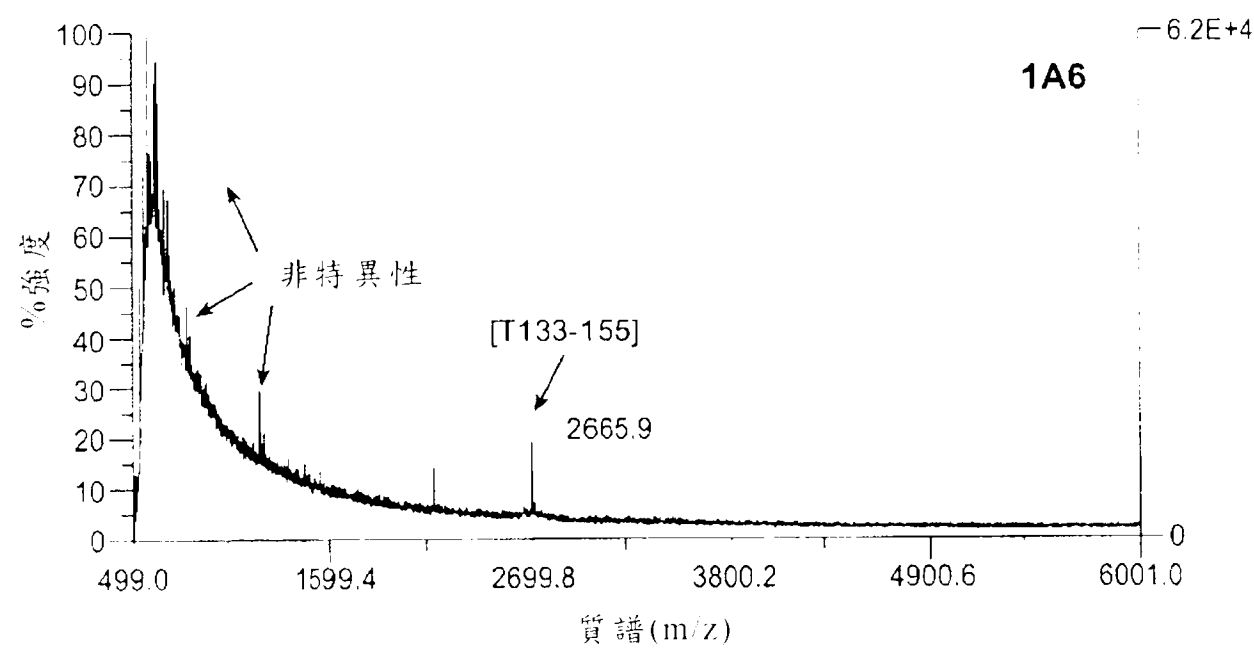


圖 6B

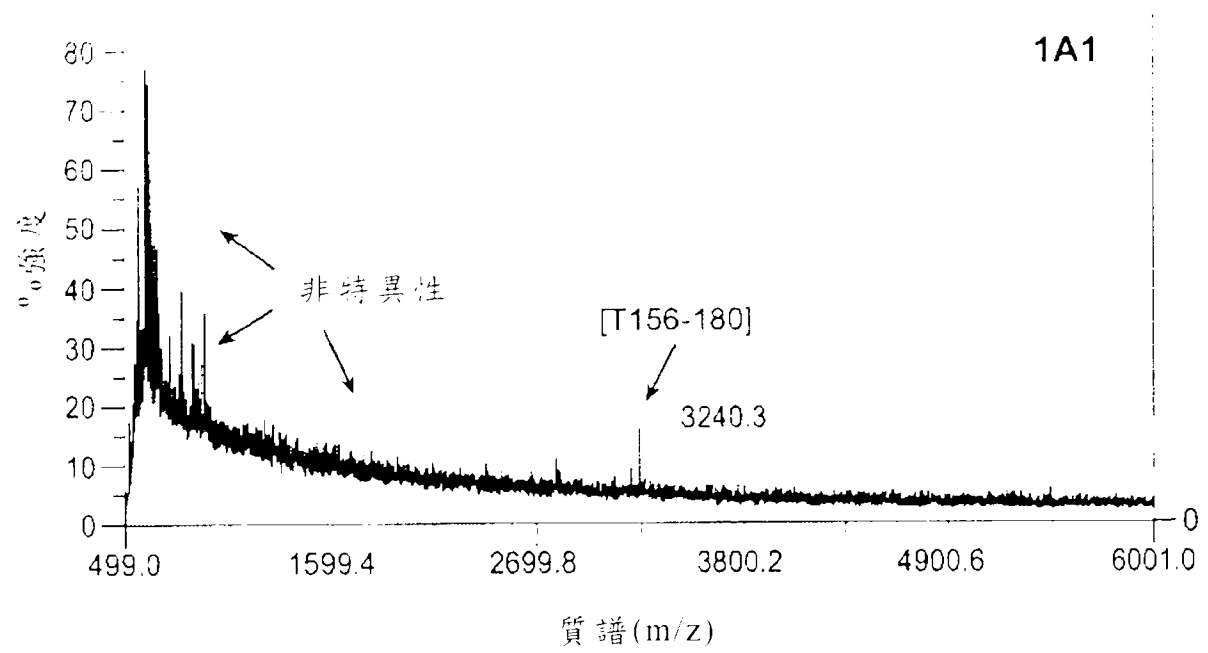


圖 6C

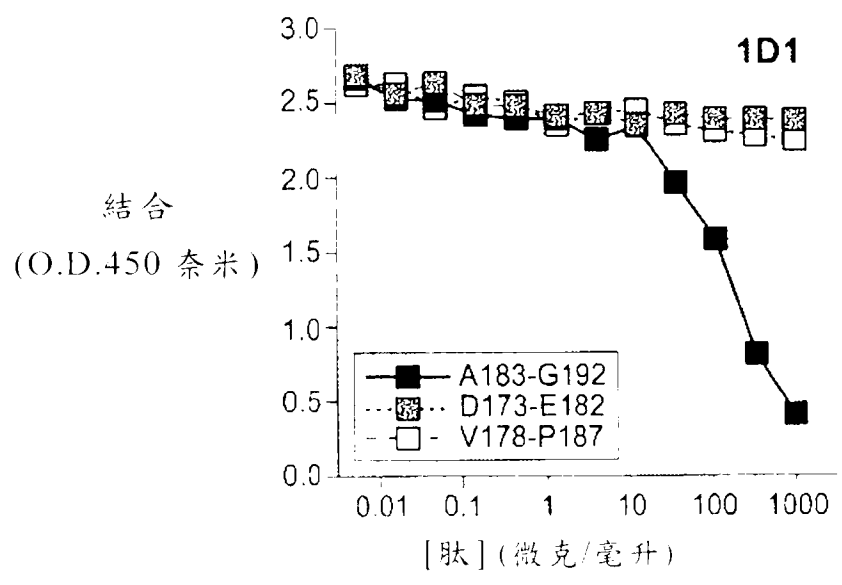


圖 6D



圖 6E

腫瘤體積
(mm³)

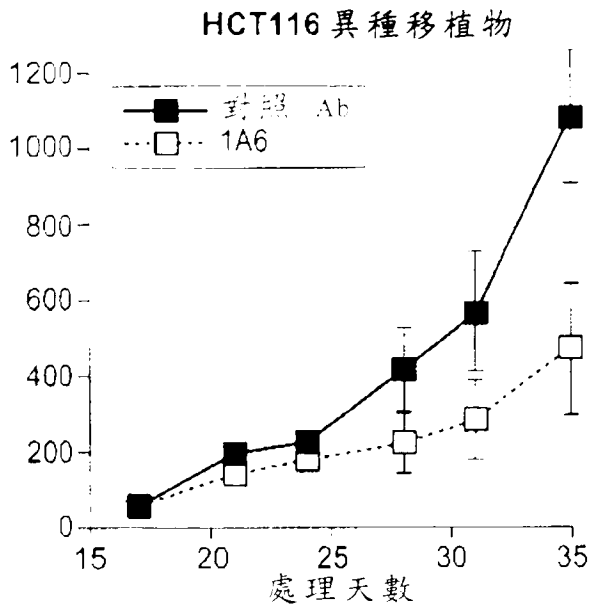


圖 7A

腫瘤體積
(mm³)

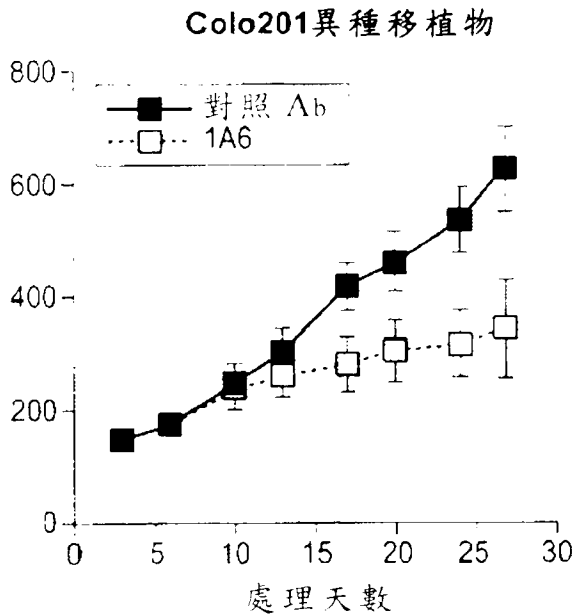


圖 7C

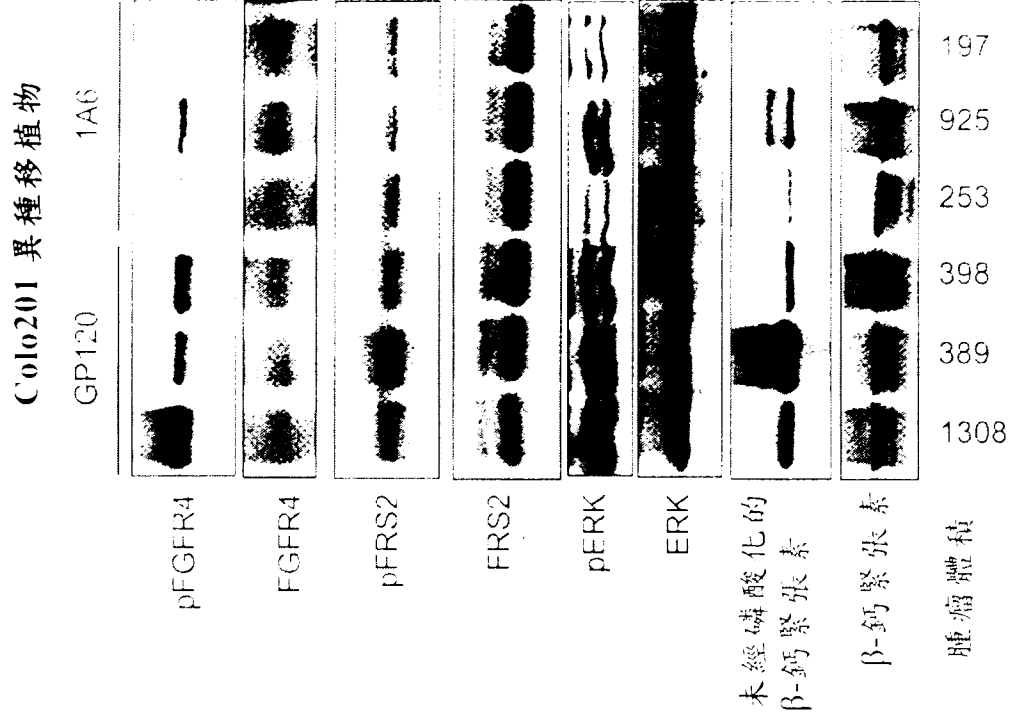


圖 7D

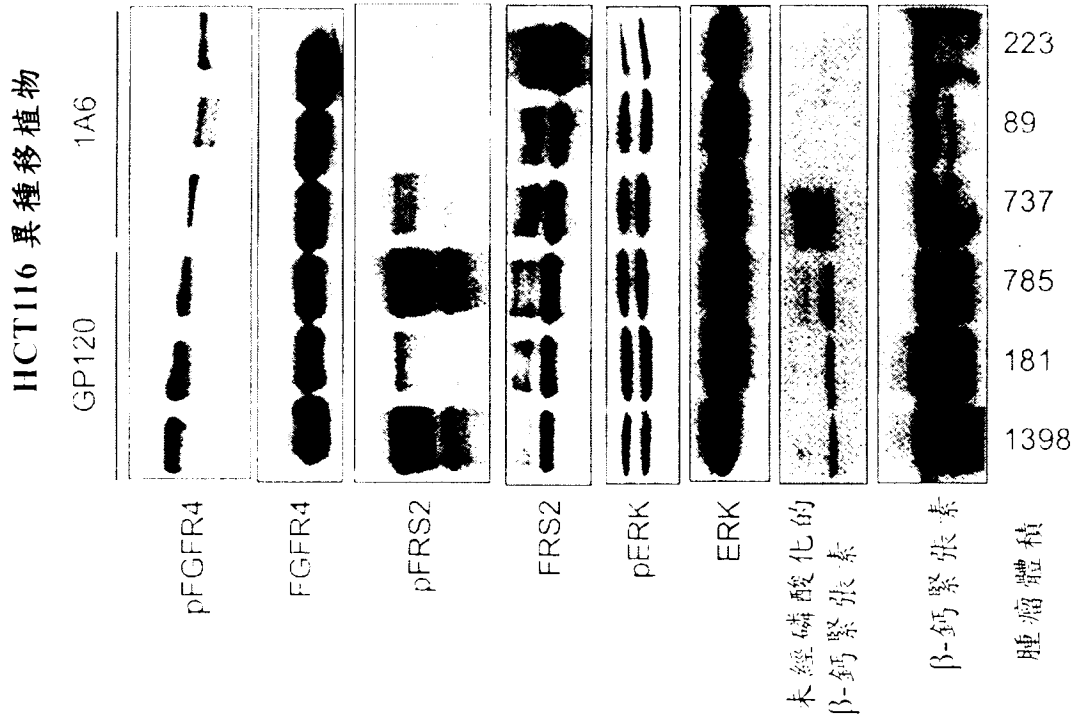


圖 7B

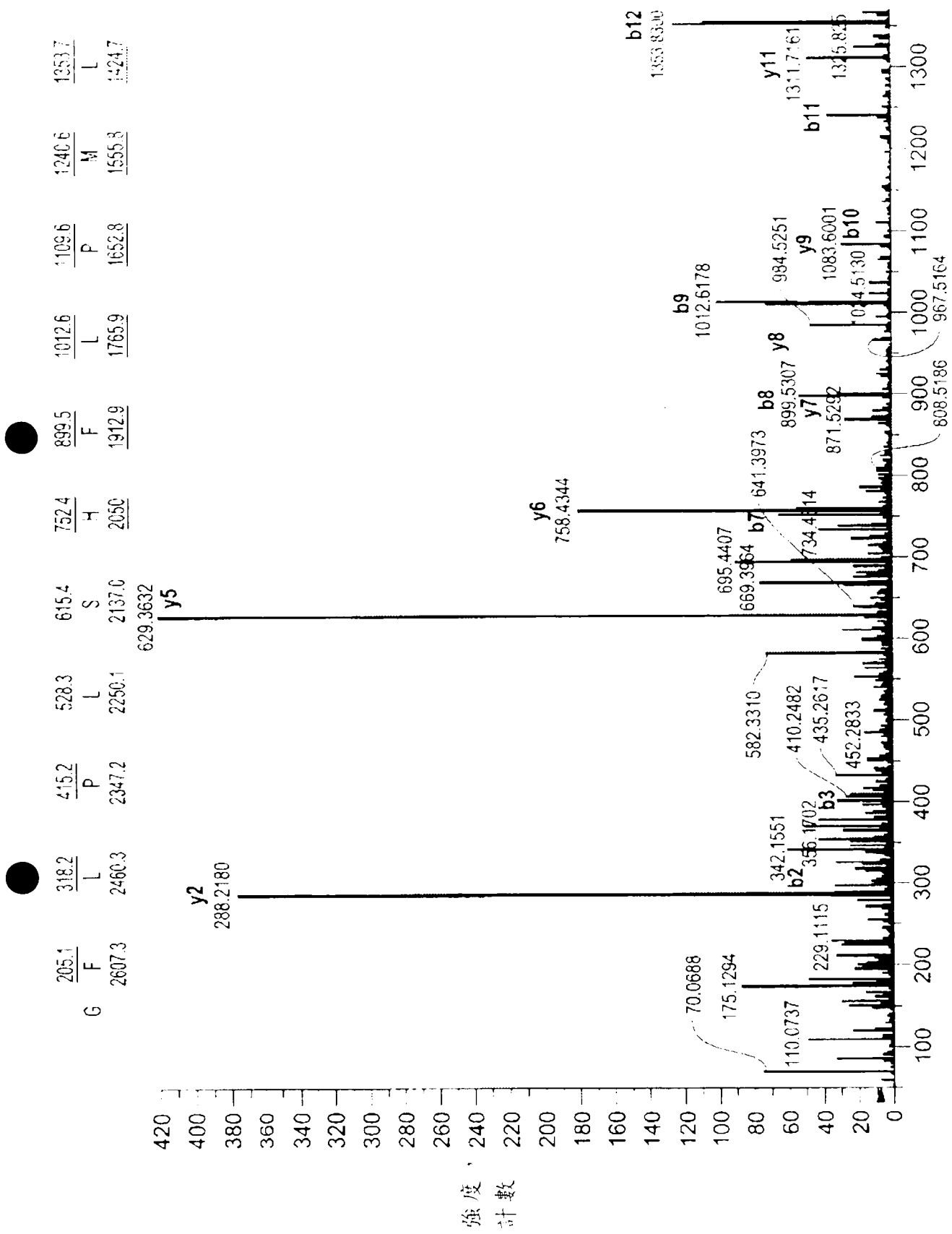


圖 8A-1

圖 8A-1

圖 8A-2

<u>1450.8</u>	<u>1581.8</u>	<u>1680.9</u>	<u>1777.9</u>	<u>1907</u>	<u>2036</u>	<u>2133.1</u>	<u>2262.1</u>	<u>2377.2</u>	<u>2490</u>
P	M	V	P	E	E	P	E	D	L
<u>1311.6</u>	<u>1214.6</u>	<u>1083.5</u>	<u>984.5</u>	<u>887.4</u>	<u>758.4</u>	<u>629.3</u>	<u>532.3</u>	<u>403.2</u>	<u>288.2</u>
									R
									<u>175.1</u>

■ +TOF 產物 (2665.0): 自 FGF_090105.wiff 試樣 1 (FGF19 IP 1A6) 之 157 MCA 掃描
a=3.5605140000000000e-004, t0=4.557157055220000010e+001

圖 8A

最大 2457.0 計數

CID of 2665 m/z

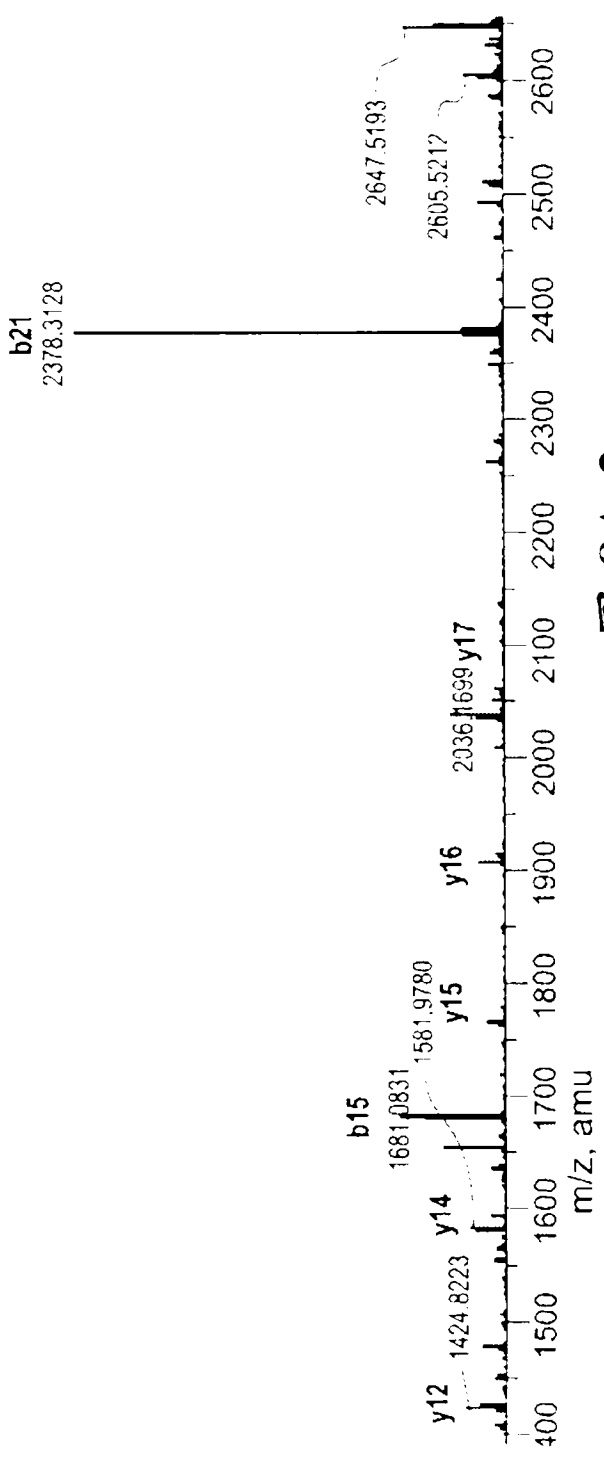


圖 8A-2

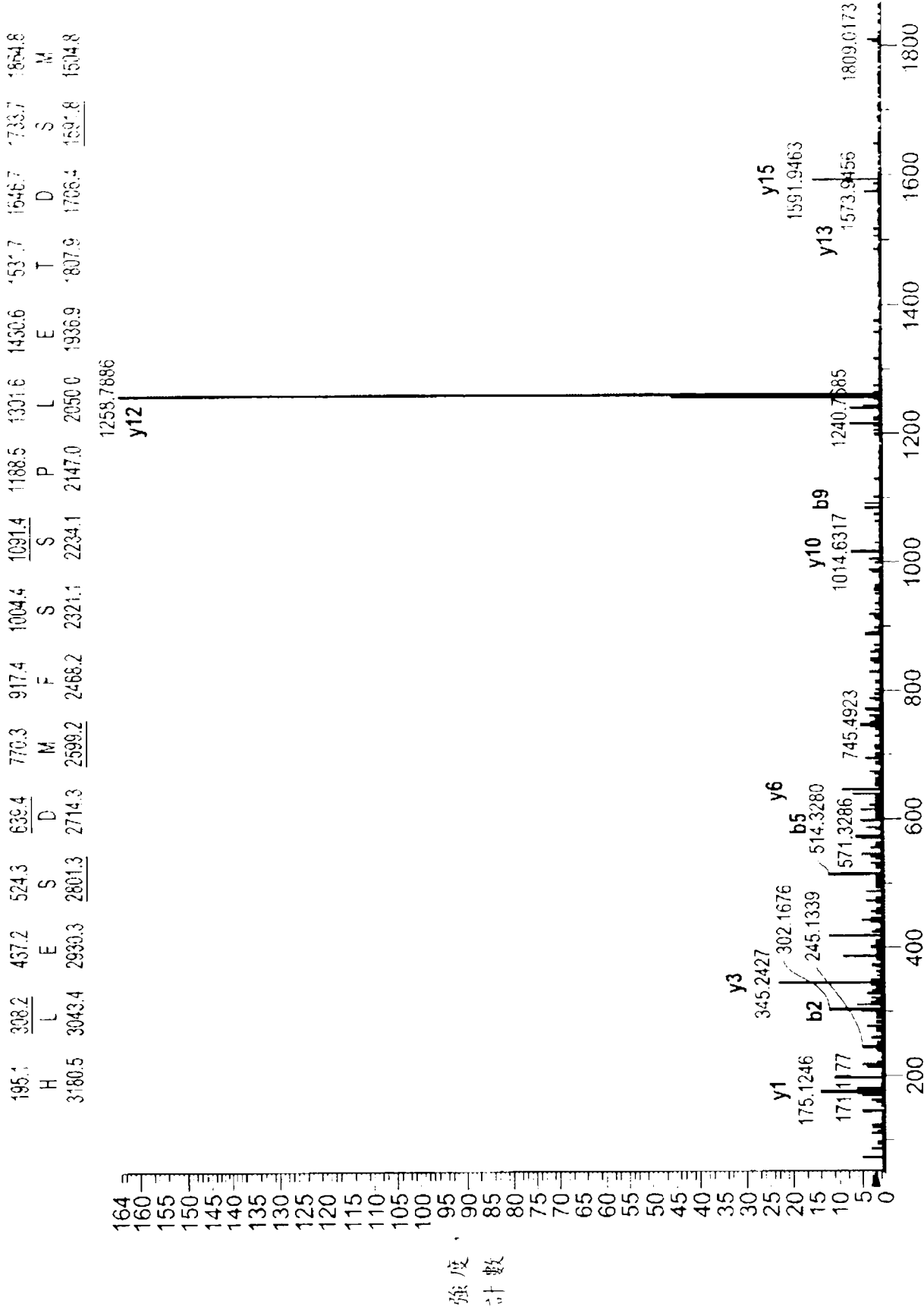


圖 8B-1

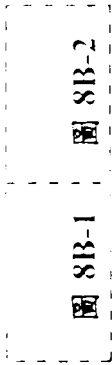


圖 8B

1979.8	2076.9	2223.9	2280.9	2394.0	2493.1	2594.1	2651.2	2764.3	2893.3	2964.3	3063.4
D	P	F	G	L	V	T	G	L	E	A	V
1373.7	1258.7	1161.7	1014.6	957.6	844.5	745.4	644.4	587.4	474.3	345.2	274.2
											R

■ +TOF 產物(3237.7): 自 FGF 090105.wiff 試樣 2 (FGF19 IP 1A1) 之 212 MCA 掃描
a=3.5605140000000000e-004, t0=4.557157055220000010e+001

最大 1640 計數

CID of 3238 m/z

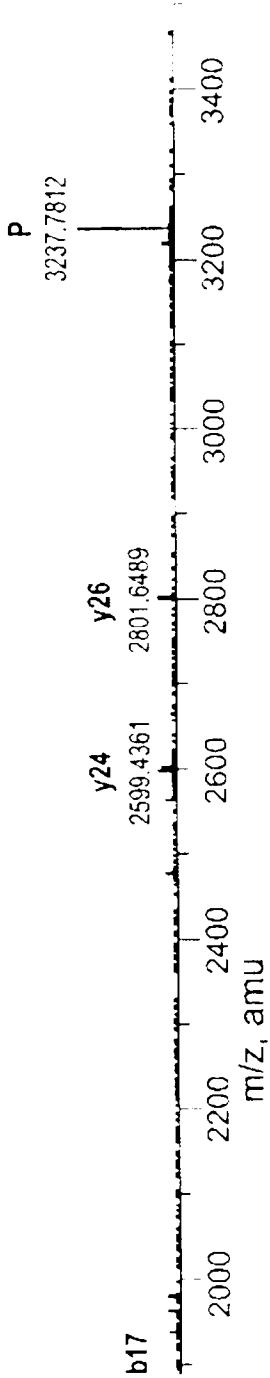
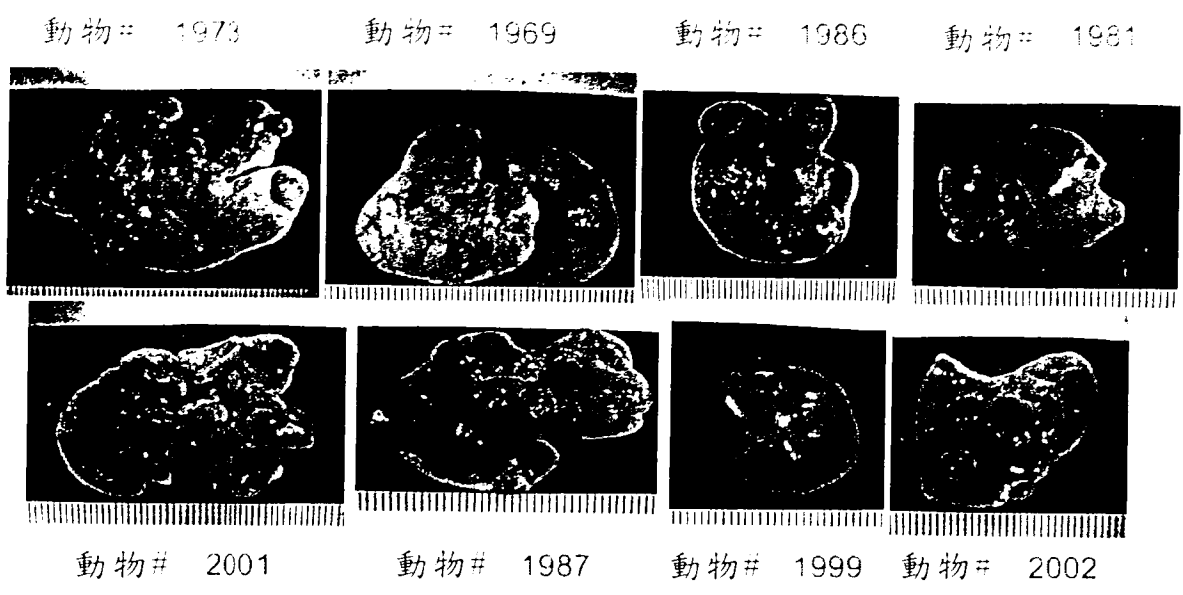


圖 8B-2

經對照Ab處理



經 1A6 處理

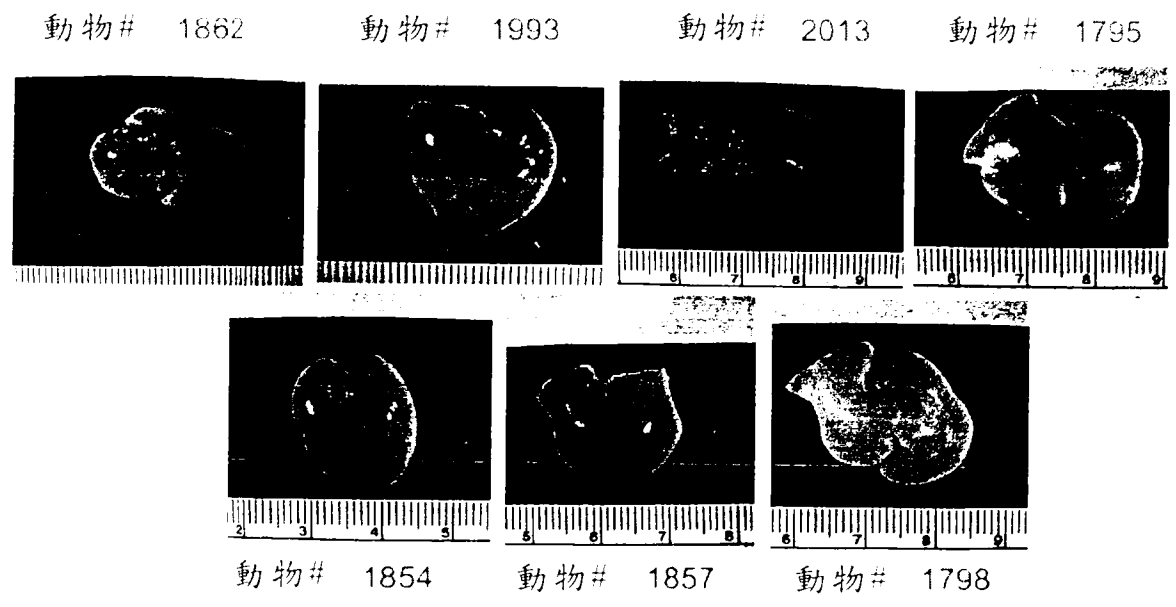
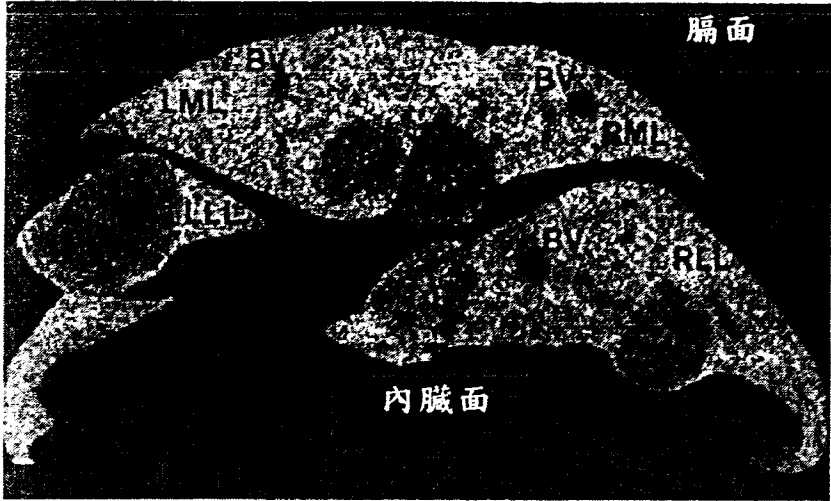


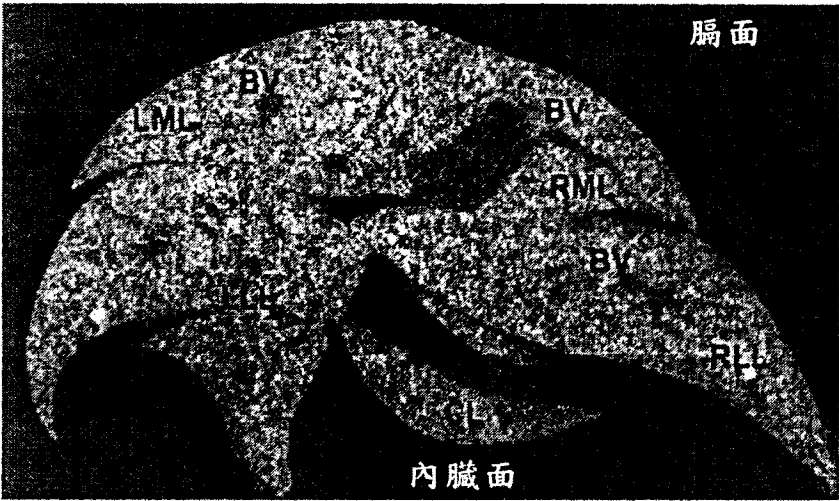
圖9A

圖 9B

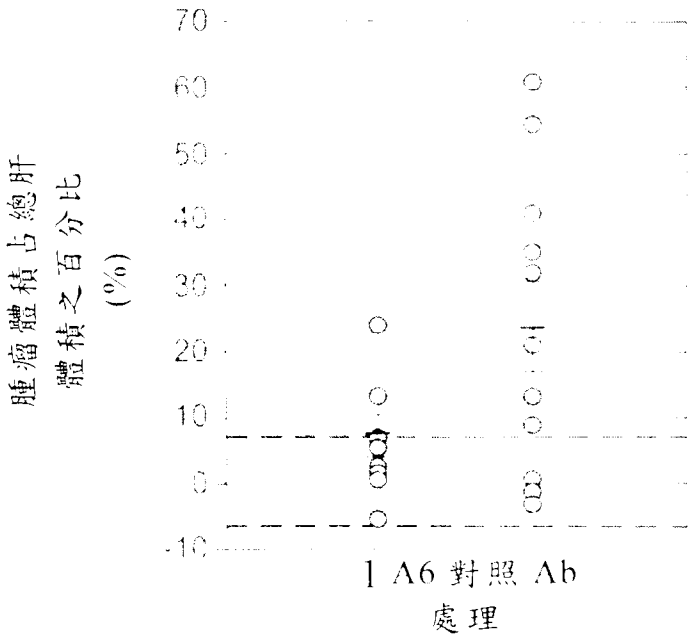
經對照 Ab 處理



經 1A6 處理



總腫瘤體積：總肝體積



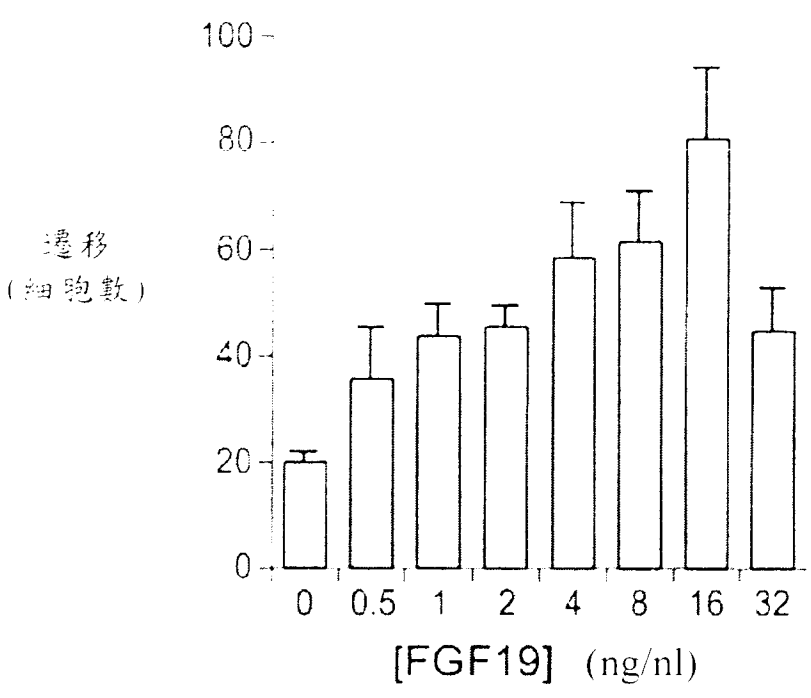


圖 10

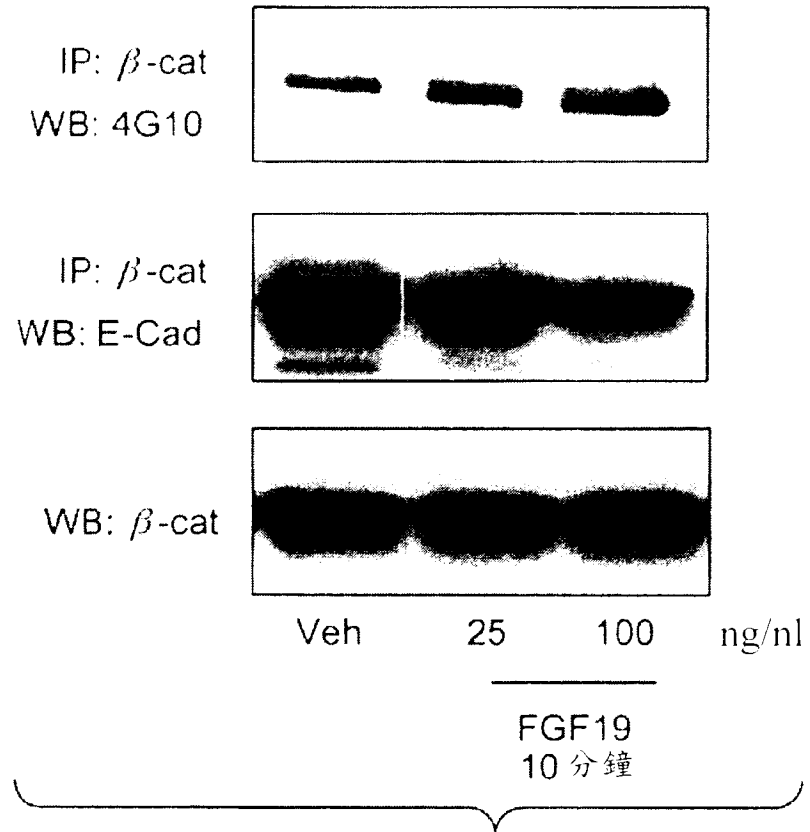


圖 11

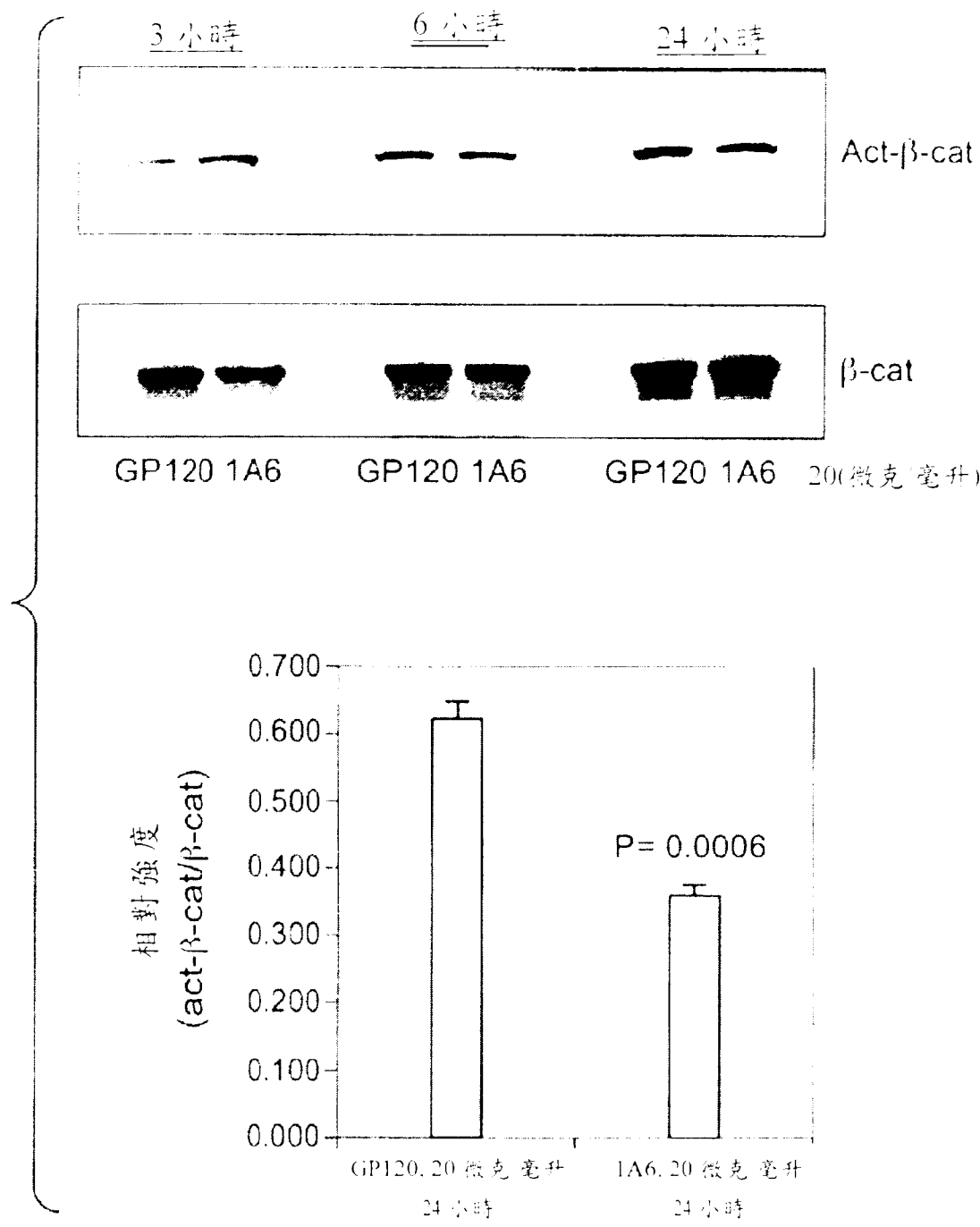


圖12

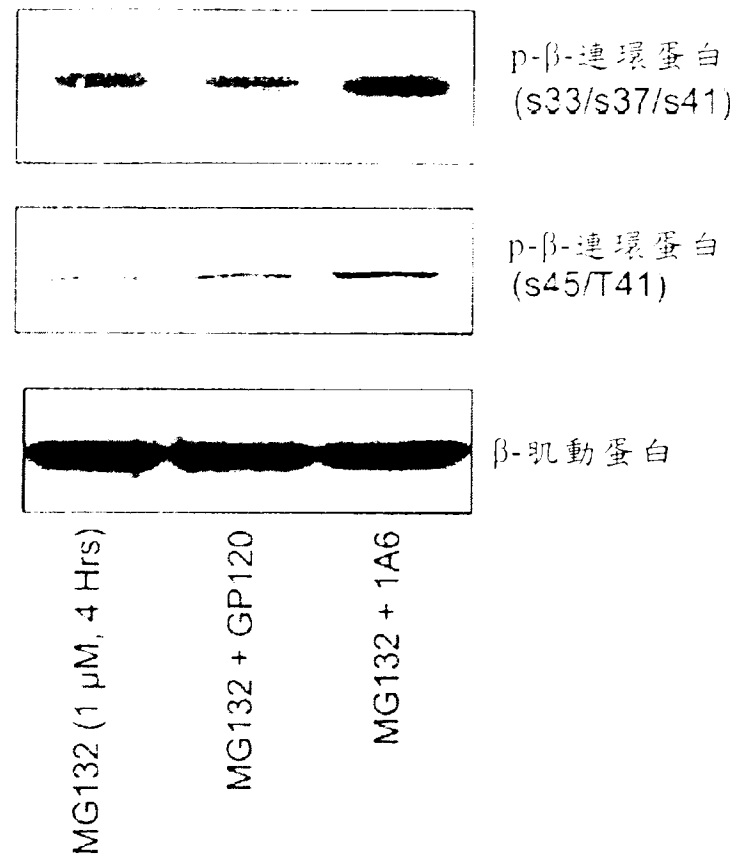
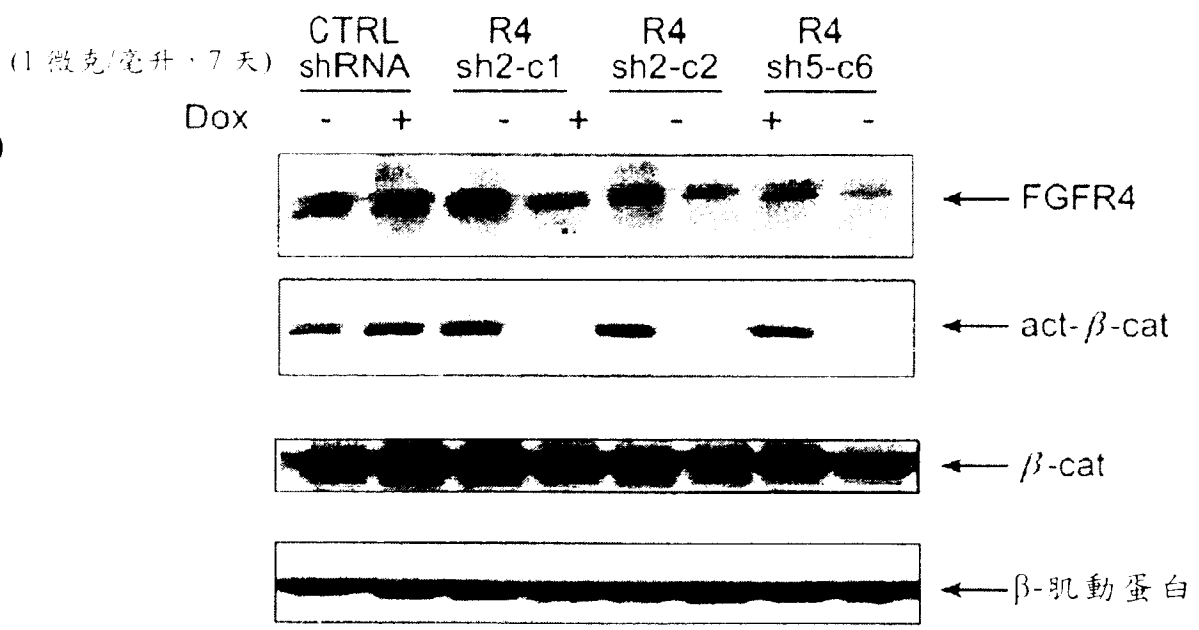


圖 13



FGFR4 shRNA, HUSH-EGFP (CTRL) : 穩定細胞系 (5 微克/毫升 嘌呤黴素)

圖 14

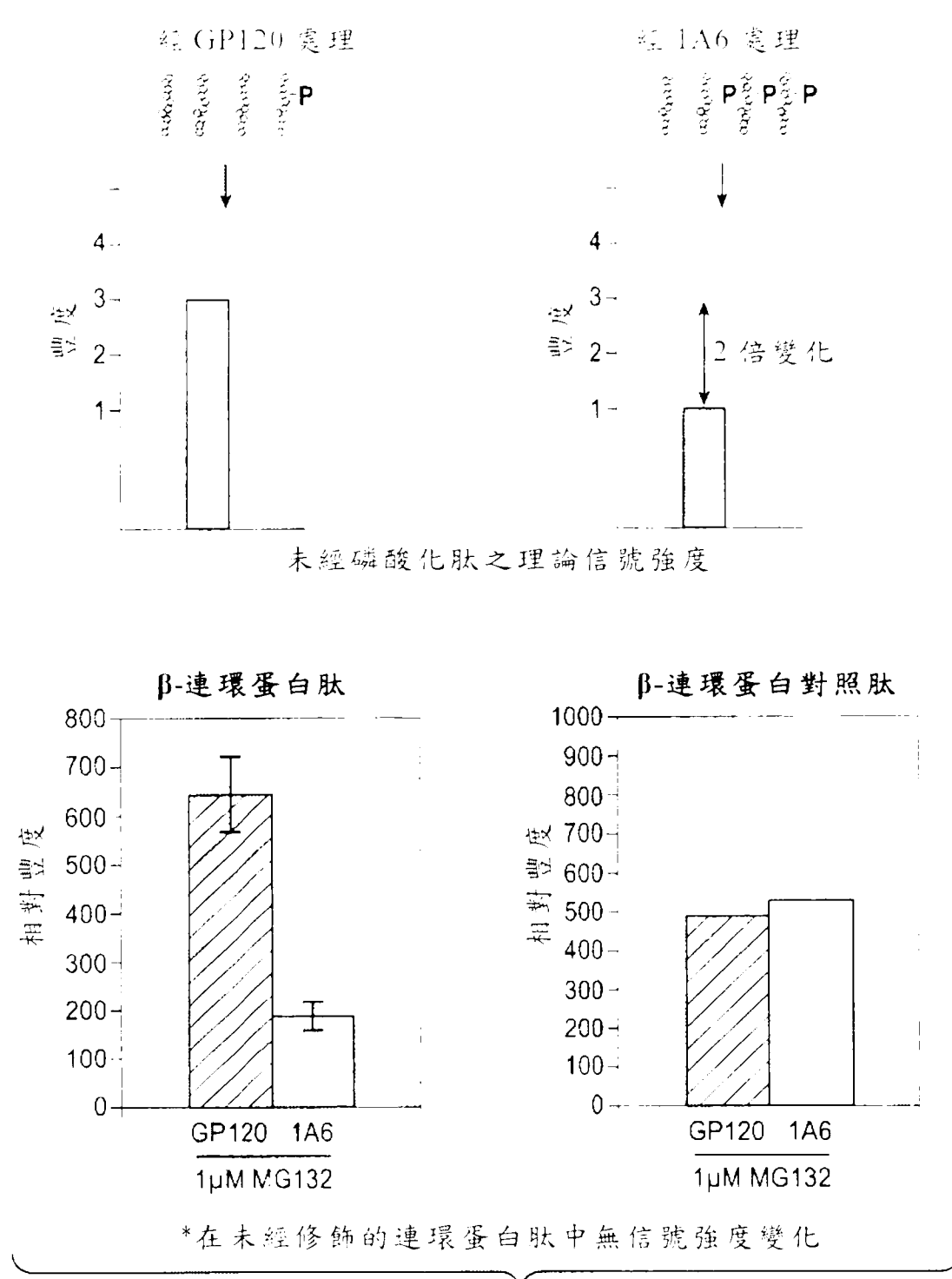


圖15

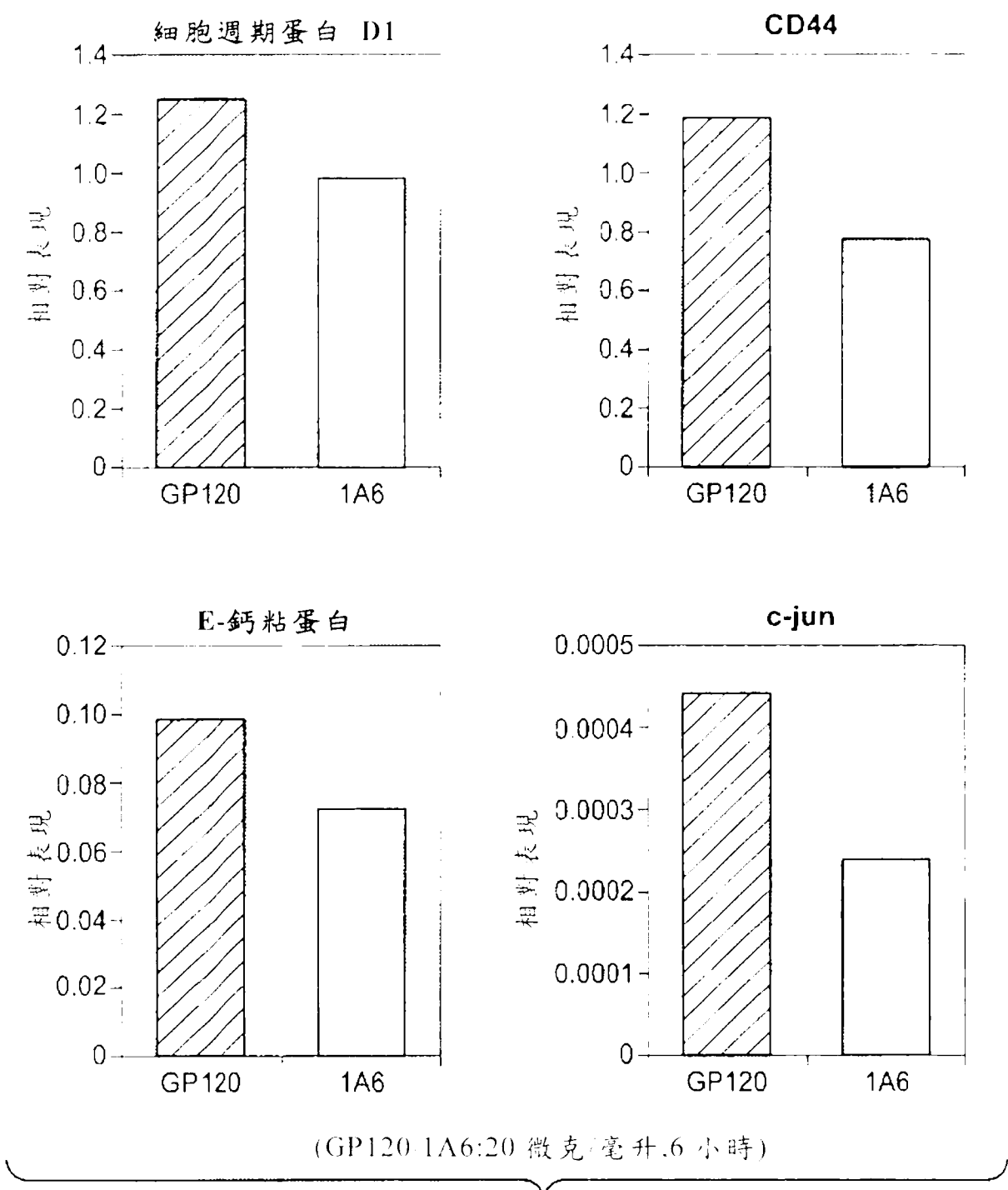


圖 16

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

十、申請專利範圍：

101年10月9日修正本

1. 一種抗-FGF19抗體，其中該抗體包含：

(a)包含下列超變區(HVR)序列之輕鏈：

(i) 包含序列 KASQDINSFLS (SEQ ID NO:1) 之 HVR-L1；

(ii) 包含序列 RANRLVD (SEQ ID NO:4之胺基酸 50-56)之 HVR-L2；及

(iii) 包含序列 LQYDEFPLT (SEQ ID NO:3)之 HVR-L3；

(b)包含下列超變區(HVR)序列之重鏈：

(i) 包含序列 TYGVH (SEQ ID NO:5)之 HVR-H1；

(ii) 包含序列 VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:6)之 HVR-H2；及

(iii) 包含序列 KEYANLYAMDY (SEQ ID NO:7)之 HVR-H3。

2. 如請求項1之抗-FGF19抗體，其中該抗體包含：一具有下列序列之輕鏈可變結構域：DIKMTQSPSSMYASLGE RVTIPCKASQDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDG VPSRFSGSGSGQDYSLTSSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLT FGAGTKVEIKR(SEQ ID NO:4)。

3. 如請求項1之抗-FGF19抗體，其中該抗體包含：一具有下列序列之重鏈可變結構域：QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGG TDYNAAFISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFC

VRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:8)。

4. 一種經分離之抗-FGF19抗體，其與如請求項1之抗體結合人類FGF19上相同的抗原決定部位。
5. 一種經分離之抗-FGF19抗體，其與如請求項1之抗體競爭結合人類FGF19。
6. 如請求項1之抗-FGF19抗體，其中該抗體之全長IgG形式以 $6 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ 或更佳之 k_{on} 值特異結合人類FGF19。
7. 如請求項6之抗-FGF19抗體，其中該 K_{off} 為 $5 \times 10^{-6} (s^{-1})$ 或更佳。
8. 一種經分離之抗-FGF19抗體，其可與之人類FGF19上之成熟人類FGF19胺基酸序列之胺基酸編號G133-R155結合。
9. 一種經分離之抗-FGF19抗體，其中該抗體與包含以下胺基酸序列之肽結合：GFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR (SEQ ID NO:9)。
10. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體抑制FGF19-促進的細胞遷移及/或FGF19誘導的細胞中CYP7 α 1基因之表現。
11. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體抑制FGF19-誘導的FGFR4、MAPK、FRS2及ERK2中一或多者之磷酸化。
12. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體抑制Wnt途徑激活。
13. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體為

單株抗體。

14. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體係選自由嵌合抗體、人類化抗體、親和性成熟抗體、人類抗體及雙重特異性抗體組成之群。
15. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體為抗體片段。
16. 如請求項1至9中任一項之抗-FGF19抗體，其中該抗體為免疫結合物。
17. 一種多核苷酸，其編碼如請求項1至15中任一項之抗體。
18. 一種載體，其包含如請求項17之多核苷酸。
19. 如請求項18之載體，其中該載體為表現載體。
20. 一種宿主細胞，其包含如請求項18或19之載體。
21. 如請求項20之宿主細胞，其中該宿主細胞係原核細胞。
22. 如請求項20之宿主細胞，其中該宿主細胞係真核細胞。
23. 如請求項20之宿主細胞，其中該宿主細胞係哺乳動物細胞。
24. 一種製造抗-FGF19抗體之方法，該方法包括(a)在適合的宿主細胞中表現如請求項19之載體，及(b)回收該抗體。
25. 如請求項24之方法，其中該宿主細胞係原核細胞。
26. 如請求項24之方法，其中該宿主細胞係真核細胞。
27. 一種組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體及醫藥上可接受之賦形劑。
28. 如請求項27之組合物，其中該組合物進一步包含第二醫

藥，其中該抗體係第一醫藥。

29. 如請求項28之組合物，其中該第二醫藥係另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞因子、細胞因子拮抗劑、細胞毒性放射治療劑、腎上腺皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、鎮痛藥或生長抑制劑。
30. 一種如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體之用途，其係用於製備治療個體之腫瘤、癌症、細胞增殖病症、復發腫瘤生長或復發腫瘤細胞生長之藥物。
31. 如請求項30之用途，其中該癌症係選自由乳腺癌、結腸直腸癌、肺癌、食管癌、膀胱癌、卵巢癌、胰腺癌及肝細胞癌組成之群。
32. 如請求項31之用途，其中該癌症係結腸直腸癌或肝細胞癌。
33. 如請求項31之用途，其中該藥物係與第二醫藥共同投與，其中該抗體係第一醫藥。
34. 如請求項33之用途，其中該第二醫藥係另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞因子、細胞因子拮抗劑、細胞毒性放射治療劑、腎上腺皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、鎮痛藥或生長抑制劑。
35. 如請求項34之用途，其中該第二醫藥係他莫昔芬(tamoxifen)、來曲唑(letrozole)、依西美坦(exemestane)、阿納托司唑(anastrozole)、伊立替康(irinotecan)、西土西

單抗(cetuximab)、氟維司群(fulvestrant)、長春瑞濱(vinorelbine)、埃羅替尼(erlotinib)、貝伐單抗(bevacizumab)、長春新鹼(vincristine)、伊馬替尼(imatinib)、索拉非尼(sorafenib)、拉帕替尼(lapatinib)或曲司佐單抗(trastuzumab)。

36. 如請求項30至35中任一項之用途，其進一步在投與該抗-FGF19抗體之前、期間或之後於該生物試樣中檢測FGF19表現或FGFR4表現。

37. 如請求項36之用途，其中該FGF19表現與對照試樣中之表現相比較係增強的表現。

38. 如請求項36之用途，其中該生物試樣係取自腫瘤。

39. 一種用於檢測與FGF19表現及/或活性有關之病症的活體外方法，該方法包含在取自個體之生物試樣中以如請求項1至16中任一項之抗FGF-19抗體檢測FGF19。

40. 如請求項39之方法，其中該FGF19表現與對照試樣中之表現相比較係增強的表現。

41. 如請求項39或40之方法，其中該病症係腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症。

42. 如請求項39或40之方法，其中該病症係結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、乳腺癌及/或胰腺癌。

43. 如請求項39或40之方法，其中該生物試樣係取自腫瘤。

44. 一種如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體之用途，其係用於製備治療個體消耗性病症之藥物。

45. 如請求項44之用途，其中該個體患有腫瘤、癌症及/或細

胞增殖病症。

46. 一種用於治療個體之腫瘤、癌症或細胞增殖病症之醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體。
47. 如請求項46之醫藥組合物，其中該癌症係選自由乳腺癌、結腸直腸癌、肺癌、食管癌、膀胱癌、卵巢癌、胰腺癌及肝細胞癌組成之群。
48. 如請求項47之醫藥組合物，其中該癌症係結腸直腸癌或肝細胞癌。
49. 如請求項46至48中任一項之醫藥組合物，此外其中在投與該抗-FGF19抗體之前、期間或之後於該個體之生物試樣中檢測FGF19表現及FGFR4表現。
50. 如請求項46之醫藥組合物，其中該醫藥組合物進一步包含有效量之第二醫藥，其中該抗體為第一醫藥。
51. 如請求項50之醫藥組合物，其中該第二醫藥係另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞因子、細胞因子拮抗劑、細胞毒性放射治療劑、腎上腺皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、鎮痛藥或生長抑制劑。
52. 一種用於治療個體消耗性病症之醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體。
53. 如請求項52之醫藥組合物，其中該個體患有腫瘤、癌症及/或細胞增殖病症。
54. 一種如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體之用途，

其係用於製備調節與FGF19之表現或活性或FGFR4之表現或活性有關之病症之藥物。

55. 如請求項54之用途，其中該病症係癌症。

56. 如請求項54之用途，其中該病症係膽汁阻塞或膽汁酸代謝失調。

57. 如請求項54之用途，其中該病症係肝硬化。

58. 一種調節與FGF19之表現或活性或FGFR4之表現或活性有關之病症之醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗-FGF19抗體。

59. 如請求項58之醫藥組合物，其中該病症係癌症。

60. 如請求項58之醫藥組合物，其中該病症係膽汁阻塞或膽汁酸代謝失調。

61. 如請求項58之醫藥組合物，其中該病症係肝硬化。