

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-528454
(P2023-528454A)

(43)公表日 令和5年7月4日(2023.7.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	Z N A	4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 6
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全74頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-574398(P2022-574398)		(71)出願人	515236259	
(86)(22)出願日	令和3年6月2日(2021.6.2)			ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日	令和5年1月26日(2023.1.26)			アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/035468			2 1 4 2・ケンブリッジ・メイン・スト	
(87)国際公開番号	WO2021/247718			リート・4 1 5	
(87)国際公開日	令和3年12月9日(2021.12.9)		(71)出願人	399052796	
(31)優先権主張番号	63/033,975			ダイナ ファーバー キャンサー インス	
(32)優先日	令和2年6月3日(2020.6.3)			ティテュート, インコーポレイテッド	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		(74)代理人	100102978	
				弁理士 清水 初志	
			(74)代理人	100102118	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子受容体2に特異的に結合する二重パラトープアンタゴニスト抗体およびその使用方法

(57)【要約】
本明細書において記載されかつ特徴とするのは、FGF受容体（例えば、FGFR2）に特異的に結合してそれを阻害する二重パラトープアンタゴニスト抗体、および胆管がん（CCA）を含むがんの処置のために前記抗体を使用する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維芽細胞増殖因子受容体2（FGFR2）の細胞外ドメイン内の2つのエピトープに特異的に結合し、抗FGFR2抗体の2つの抗原結合断片を含む、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記抗FGFR2抗体が、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、および12433からなる群より選択される、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 3】

線維芽細胞増殖因子受容体2（FGFR2）の細胞外ドメイン内の2つのエピトープに特異的に結合し、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、および12433からなる群より選択される抗体の抗原結合断片を含む、二重パラトープ（biparatopic）抗体。

10

【請求項 4】

前記抗体の1つまたは複数の相補性決定領域を含む、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 5】

重鎖可変ドメイン（VH）または軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 6】

FGFR2のシグナルペプチド（SP）もしくは免疫グロブリン様ドメインIgI、IgII、IgIII、IgIIおよびIgIII、またはそれらの他の組合せに特異的に結合する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

20

【請求項 7】

FGFR2の免疫グロブリン様ドメインIgI、IgII、またはIgIIIに特異的に結合する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 8】

FGFR2の免疫グロブリン様ドメインの2つの断片に特異的に結合し、前記断片が、IgIおよびIgIIに、IgIおよびIgIIIに、またはIgIIおよびIgIIIに由来する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 9】

FGFR2の免疫グロブリン様ドメインIgI、IgII、IgIII、またはシグナルペプチド（SP）、IgIIおよびIgIIIの2つの断片に特異的に結合する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

30

【請求項 10】

前記抗体またはポリペプチドの結合によりFGFR2へのリガンドの結合が阻止される、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体またはポリペプチドの結合によりFGFR2活性が低下する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗原結合断片が、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433の配列に対する少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

40

【請求項 13】

前記抗原結合断片が、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433の配列に対する少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗原結合断片が、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433の配列に対する少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項

50

1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項15】

前記抗原結合断片が、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、もしくは12433の相補性決定領域を含むか、または本質的に前記相補性決定領域からなる、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項16】

前記ポリペプチドが親和性タグを含む、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

【請求項17】

前記ポリペプチドが、検出可能なアミノ酸配列を含む、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の抗体。

10

【請求項18】

抗体M048-D01および抗体12433のFGFR2抗原結合断片;または抗体GAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片;またはHuGAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片;または抗体HuGAL-FR21および抗体GAL-FR23の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片;または抗体M048-D01および抗体12433の抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体10164の抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体2B 1.3.12の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体HuGAL-FR21の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む、請求項3～17のいずれか一項記載の二重パラトープ抗体。

20

【請求項19】

FGFR2への結合について約 7.7×10^{-9} ～約 9.1×10^{-10} のKDを有する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の二重パラトープ抗体。

【請求項20】

FGFR2への結合について約 1.3×10^{-9} 、 7.7×10^{-9} 、 2.5×10^{-10} 、 3.7×10^{-10} 、 3.9×10^{-10} 、 4.2×10^{-10} 、 5.0×10^{-10} 、 5.3×10^{-10} 、 6.8×10^{-10} 、 7.7×10^{-10} 、 8.7×10^{-10} 、および 9.1×10^{-10} からなる群より選択されるKDを有する、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の二重パラトープ抗体。

【請求項21】

腫瘍細胞の増殖を阻害するかまたは腫瘍細胞の生存を低減させる方法であって、前記細胞を請求項1～20のいずれか一項記載のポリペプチドまたは抗体の有効量と接触させ、それにより、増殖を阻害するかまたは生存度を低下させることを含む、前記方法。

30

【請求項22】

前記ポリペプチドまたは抗体が前記腫瘍細胞の細胞死を誘導する、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記腫瘍細胞が、胆管がん(CCA)細胞、子宮内膜がん細胞、黒色腫細胞、食道がん細胞、膀胱がん細胞、乳がん細胞、または肺がん細胞である、請求項21記載の方法。

【請求項24】

前記細胞がインビトロのものである、請求項21記載の方法。

40

【請求項25】

前記細胞がインビボの細胞である、請求項21記載の方法。

【請求項26】

対象のがんを処置する方法であって、前記対象に請求項1～20のいずれか一項記載のポリペプチドまたは抗体の有効量を投与し、それにより前記がんを処置することを含む、前記方法。

【請求項27】

前記がんが、胆管がん(CCA)、子宮内膜がん、黒色腫、食道がん、膀胱がん、乳がん、または肺がんである、請求項26記載の方法。

50

【請求項 28】

対象の胆管がんを処置する方法であって、前記対象に、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433からなる群より選択される抗体の抗原結合断片を含む二重パラトープ抗体の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 29】

前記対象に、抗体M048-D01および抗体12433のFGFR2抗原結合断片；または抗体GAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片；またはHuGAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片；または抗体HuGAL-FR21および抗体GAL-FR23の抗原結合断片；または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片；または抗体M048-D01および抗体12433の抗原結合断片；または抗体2B 1.3.12および抗体10164の抗原結合断片；または抗体2B 1.3.12および抗体12433の抗原結合断片；または抗体GAL-FR23および抗体2B 1.3.12の抗原結合断片；または抗体GAL-FR23および抗体HuGAL-FR21の抗原結合断片；または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む二重パラトープ抗体の有効量を投与することを含む、請求項28記載の方法。

10

【請求項 30】

前記二重パラトープ抗体がFGFR2への結合について約 7.7×10^{-9} ～約 9.1×10^{-10} のKDを有する、請求項28または29記載の方法。

【請求項 31】

請求項1～20のいずれか一項記載のポリペプチドまたは抗体をコードする、単離された核酸分子。

20

【請求項 32】

請求項1～20のいずれか一項記載のポリペプチドまたは抗体をコードする核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 33】

発現ベクターである、請求項32記載のベクター。

【請求項 34】

前記発現ベクターがウイルス発現ベクターまたは非ウイルス発現ベクターである、請求項32記載のベクター。

【請求項 35】

前記発現ベクターが、前記ポリペプチドにまたは抗体に機能的に連結された親和性タグまたは検出可能なアミノ酸配列をコードする、請求項32～34のいずれか一項記載のベクター。

30

【請求項 36】

請求項32～35のいずれか一項記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 37】

薬学的に許容される賦形剤中に請求項1～20のいずれか一項記載のポリペプチドもしくは抗体またはそれらの断片の有効量を含む、薬学的組成物。

【請求項 38】

対象の胆管がんを処置する方法であって、前記対象に請求項1～20のいずれか一項記載の抗体の有効量およびペミガチニブまたはNVP-BGJ398の有効量を投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 39】

抗体HuGAL-FR21および抗体12433のFGFR2抗原結合断片；または抗体HuGAL-FR21および抗体GAL-FR23の抗原結合断片；または抗体GAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片；または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む前記二重パラトープ抗体が、FGFR2融合体を発現している細胞の成長を阻害した、請求項18記載の二重パラトープ抗体。

【請求項 40】

前記FGFR2融合体がFGFR2-PHGDHである、請求項39記載の二重パラトープ抗体。

【請求項 41】

50

抗体2B 1.3.12および抗体10164のFGFR2抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体2B 1.3.12の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体HuGAL-FR21の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む前記二重パラトープ抗体が、FGFR2融合体を発現している細胞の成長を阻害した、請求項18記載の二重パラトープ抗体。

【請求項42】

前記FGFR2融合体がFGFR2-BICC1である、請求項41記載の二重パラトープ抗体。

【請求項43】

前記対象の細胞がFGFR2融合体を含む、請求項28～30または38のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

前記FGFR2融合体がFGFR2-PHGDHまたはFGFR2-BICC1である、請求項43記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本PCT出願は、2020年6月3日に出願された米国仮特許出願第63/033,975号の優先権および恩典を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

背景

胆管がん(CCA)は胆道から生じる急速進行型の腫瘍であり、処置の選択肢が限られていて、全生存率は悪い。線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)経路は細胞の生存および分化に必要とされる細胞プロセスに関与しており、異常なFGFRシグナル伝達が発がん性変化をもたらし得る。最近、FGFR2遺伝子融合体がCCAと関連していることがわかった。したがって、FGFRを阻害する作用物質はCCAの処置に有用である可能性が高い。

【0003】

アンタゴニスト抗体の開発は大きな臨床的潜在可能性を有する治療戦略である。しかしながら、臨床有効性を得るには依然として課題がある。二重特異性抗体および二重パラトープ(biparatopic)抗体は、その単一特異性の対応物と比べて固有の作用機序を可能にする新たに現れたクラスの薬物分子である。二重特異性抗体は、各々が相違する抗原に結合する2つのFab可変ドメインを含む単一分子である。二重特異性抗体のヘテロ二量体形成へのアセンブリを駆動するためにノブ・イントゥ・ホール(knob-into-hole)技術が使用されている。二重パラトープ抗体は、各々が単一の抗原上の相違するエピトープに結合する2つのFab可変ドメインを含む分子である。多くの二価抗体はアゴニストとして作用する。FGFR2受容体に対する二重パラトープアンタゴニスト抗体によってCCAの処置のための重要な治療薬がもたらされると考えられ、かつこのような作用物質が緊急に必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

概要

本明細書において特徴とするのは、FGF受容体(例えば、FGFR2)に特異的に結合してそれを阻害する二重パラトープアンタゴニスト抗体、および胆管がん(CCA)を含むがんの処置のためにこのような抗体を使用する方法である。

【0005】

一局面において、線維芽細胞増殖因子受容体2(FGFR2)の細胞外ドメイン内の2つのエピトープに特異的に結合し、抗FGFR2抗体の2つの抗原結合断片を含む、ポリペプチドを提供する。一態様において、抗FGFR2抗体はM048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、および12433のうちのいずれか1つまたは複数である。

10

20

30

40

50

【0006】

別の局面において、線維芽細胞増殖因子受容体2 (FGFR2) の細胞外ドメイン内の2つのエピトープに特異的に結合し、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、および12433のうちのいずれか1つまたは複数から選択される抗体の抗原結合断片を含む、二重パラトープ抗体を提供する。

【0007】

別の局面において、腫瘍細胞の増殖を阻害するかまたは腫瘍細胞の生存を低減させる方法であって、前記細胞を先のいずれかの局面のポリペプチドまたは抗体の有効量と接触させ、それにより、増殖を阻害するかまたは生存度を低下させることを含む、方法を提供する。一態様において、前記ポリペプチドまたは抗体は腫瘍細胞の細胞死を誘導する。別の態様において、腫瘍細胞は胆管がん (CCA) 細胞である。別の態様において、前記細胞はインビトロまたはインビボである。

10

【0008】

別の局面において、対象のがんを処置する方法であって、対象に先のいずれかの局面のポリペプチドまたは抗体の有効量を投与し、それによりがんを処置することを含む、方法を提供する。一態様において、腫瘍細胞は胆管がん (CCA) 細胞である。

【0009】

別の局面において、対象の胆管がんを処置する方法であって、対象に、M048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433からなる群より選択される抗体の抗原結合断片を含む二重パラトープ抗体の有効量を投与することを含む、方法を提供する。前記方法の一態様において、抗体M048-D01および抗体12433のFGFR2抗原結合断片;または抗体GAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片またはHuGAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片;または抗体HuGAL-FR21および抗体GAL-FR23の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片;または抗体M048-D01および抗体12433の抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体10164の抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体2B 1.3.12の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体HuGAL-FR21の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む二重パラトープ抗体の有効量が対象に投与される。一態様において、対象の細胞はFGFR2融合体を含む。一態様において、FGFR2融合体はFGFR2-PHGDHまたはFGFR2-BICC1である。前記方法の一態様において、二重パラトープ抗体はFGFR2への結合について約 7.7×10^{-9} ~約 9.1×10^{-10} のKDを有する。

20

30

【0010】

別の局面において、先のいずれかの局面のポリペプチドまたは抗体をコードする単離された核酸分子が提供される。

【0011】

別の局面において、先のいずれかの局面のポリペプチドまたは抗体をコードする核酸分子を含むベクターが提供される。一態様において、ベクターは発現ベクターである。別の態様において、発現ベクターはウイルス発現ベクターまたは非ウイルス発現ベクターである。別の態様において、発現ベクターは、前記ポリペプチドにまたは抗体に機能的に連結された親和性タグまたは検出可能なアミノ酸配列をコードする。

40

【0012】

別の局面において、先のいずれかの局面のベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0013】

別の局面において、薬学的に許容される賦形剤中に先のいずれかの局面のポリペプチドもしくは抗体またはそれらの断片の有効量を含む薬学的組成物が提供される。

【0014】

別の局面において、対象の胆管がんを処置する方法であって、対象に先のいずれかの局面の抗体の有効量およびベミガチニブまたはNVP-BGJ398の有効量を投与することを含む、方法を提供する。

50

【0015】

上記の局面のいずれかの種々の態様または本明細書に示されるような任意の他の局面および/もしくはその態様において、前記ポリペプチドまたは抗体は前記抗体の1つまたは複数の相補性決定領域を含む。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記ポリペプチドまたは抗体は重鎖可変ドメイン（VH）または軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記抗体またはポリペプチドはFGFR2のシグナルペプチド（SP）または免疫グロブリン様ドメインIgI、IgII、もしくはIgIIIに特異的に結合する。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記抗体またはポリペプチドはFGFR2の免疫グロブリン様ドメインIgI、IgII、またはIgIIIに特異的に結合する。上記の局面のいずれかの特定の態様において、前記抗体は、SPおよびIgIに、SPおよびIgIIに、SPおよびIgIIIに、SPおよびIgII+IgIIIに、IgIおよびIgIIに、IgIおよびIgIIIに、IgIおよびIgII+IgIIIに、IgIIおよびIgIIIに、IgIIおよびIgII+IgIIIに、またはIgIIIおよびIgII+IgIIIに結合する。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記抗体またはポリペプチドはFGFR2の免疫グロブリン様ドメインの2つの断片に特異的に結合し、前記断片はIgIおよびIgIIに、IgIおよびIgIIIに、またはIgIIおよびIgIIIに由来する。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記抗体またはポリペプチドはFGFR2の免疫グロブリン様ドメインIgI、IgII、またはIgIIIの2つの断片に特異的に結合する。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記抗体またはポリペプチドの結合によりFGFR2へのリガンドの結合が阻止される。上記の局面のいずれかまたは本明細書に示されるような任意の他の局面の種々の態様において、前記抗体またはポリペプチドの結合によりFGFR2活性が低下する。別の態様において、抗原結合断片はM048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433の配列に対する少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する。別の態様において、抗原結合断片はM048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433の配列に対する少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する。別の態様において、抗原結合断片はM048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、または12433の配列に対する少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する。別の態様において、抗原結合断片はM048-D01、GAL-FR23、10164、2B 1.3.12、GAL-FR21、もしくは12433の相補性決定領域を含むか、または本質的に前記相補性決定領域からなる。別の態様において、前記ポリペプチドは親和性タグを含む。別の態様において、前記ポリペプチドは検出可能なアミノ酸配列を含む。

【0016】

他の態様において、上記の局面および/またはその態様の二重パラトープ抗体は、抗体M048-D01および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片またはHuGAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片;または抗体HuGAL-FR21および抗体GAL-FR23の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片;または抗体M048-D01および抗体12433の抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体10164の抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体2B 1.3.12の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体HuGAL-FR21の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む。

【0017】

他の態様において、上記のいずれかの局面および/またはその態様のポリペプチドまたは二重パラトープ抗体はFGFR2への結合について約 7.7×10^{-9} ～約 9.1×10^{-10} のKDを有する。他の態様において、上記の局面および/またはその態様のポリペプチドまたは二重パラトープ抗体は、FGFR2への結合について約 1.3×10^{-9} 、 7.7×10^{-9} 、 2.5×10^{-10} 、 3.7×10^{-10} 、 3.9×10^{-10} 、 4.2×10^{-10} 、 5.0×10^{-10} 、 5.3×10^{-10} 、 6.8×10^{-10} 、 7.7×10^{-10} 、 8.7×10^{-10} 、ま

たは 9.1×10^{-10} から選択されるKDを有する。

【0018】

上記に示した局面またはその態様の他の態様において、抗体HuGAL-FR21および抗体12433のFGFR2抗原結合断片;または抗体HuGAL-FR21および抗体GAL-FR23の抗原結合断片;または抗体GAL-FR21および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む二重パラトープ抗体は、FGFR2融合体を発現または過剰発現している細胞の成長を阻害した。一態様において、FGFR2融合体はFGFR1-PHGDHである。上記の局面またはその態様の他の態様において、抗体2B 1.3.12および抗体10164のFGFR2抗原結合断片;または抗体2B 1.3.12および抗体12433の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体2B 1.3.12の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体HuGAL-FR21の抗原結合断片;または抗体GAL-FR23および抗体12433の抗原結合断片を含む二重パラトープ抗体は、FGFR2融合体を発現または過剰発現している細胞の成長を阻害した。一態様において、FGFR2融合体はFGFR2-BICC1である。

10

【0019】

定義

別途定義される場合を除き、本明細書において使用するすべての技術用語および科学用語は、本明細書に記載の局面および態様が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、当業者に本記載の局面および態様において使用されている用語の多くの一般的な定義を提供する: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed.1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed.,1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書において使用する場合、以下の用語は、別途明記される場合を除き、前記用語について以下に示す意味を有する。

20

【0020】

「作用物質」とは小分子化合物、タンパク質、核酸分子、またはその断片を意図する。種々の態様において、FGF受容体（例えば、FGFR2）に結合して拮抗する作用物質（例えば、二重パラトープ抗体およびその断片）を提供する。

30

【0021】

「寛解させる」とは、疾患の発症または進行が低減される、抑制される、減弱される、減退する、停止する、または安定することを意図する。胆管がんは、本明細書に記載の二重パラトープ抗体を用いた処置に適する例示的な疾患の一例である。

【0022】

本明細書において使用する場合、用語「抗体」(Ab)は、特定の抗原に特異的に結合するか、または特定の抗原と免疫学的に反応性である免疫グロブリン分子を示し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、遺伝子操作された形態の抗体および分子操作された形態の抗体、ならびに別の様式で改変された形態の抗体、例えば限定するわけではないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性 三重特異性および四重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディならびにテトラボディ）ならびに抗体の抗原結合断片、例えば、Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rlgG、およびscFv断片などを包含する。さらに、特に記載のない限り、用語「モノクローナル抗体」(mAb)は、インタクトな分子ならびに標的タンパク質に特異的に結合することができる抗体断片（例えば、FabおよびF(ab')₂断片など）の両方を包含していることを意図する。FabおよびF(ab')₂断片はインタクトな抗体のFc断片がなく、動物の循環系からより速やかに消失し、インタクトな抗体より低い非特異的組織結合性を有し得る(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316, 1983を参照のこと; 参照により本明細書に組み入れられる)。一態様において、抗体は二重パラトープ抗体である。以下に定義する例示的な抗体A~Fは、本明細書に記載の種々の局面および態様の方法において有用である。限定することを意

40

50

図しないが、二重特異性抗体は、単一分子として2つの異なる抗原またはエピトープ（抗原ドメイン）を同時に認識して結合する能力を備えている。二重特異性抗体のサブセットを構成する二重パラトープ抗体は、同じ標的抗原上の2つの異なるエピトープまたは抗原性部位を認識して結合する能力を備えている抗原結合部位（パラトープ）を含む。一態様において、二重パラトープ抗体の抗原結合ドメインは、同じ標的抗原、例えば受容体上の固有の非オーバーラップエピトープを認識して結合する。一態様において、受容体はFGFR受容体、例えば、FGFR1、FGFR2、FGFR2 α IIIb、FGFR3、およびFGFR4である。このような抗体は、疾患、例えばCCAの処置における使用のための有益な治療用抗体として好都合である。

【0023】

「M048-D01ポリペプチド」（抗体Aとも称する）とは、WO2013076186に記載の、FGFR2に特異的に結合するM048-D01の抗体配列に対する少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する抗体またはその抗原結合断片を意図する。複数の態様において、前記抗体またはその抗原結合断片はM048-D01の抗体配列に対する少なくとも約90%、93%、95%、98%、99%、またはそれより高いアミノ酸配列同一性を有する。M048-D01の例示的な配列を以下に示す。

【0024】

M048-D01 VH鎖

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
			50			55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70				75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Val	Arg	Tyr	Asn	Trp	Asn	His	Gly	Asp	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	
			100				105						110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120									

10

20

30

【0025】

M048-D01 VL鎖

WO2013076186のSEQ ID NO:32を以下に示す。

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
1				5					10					15		
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn	
			20					25					30			
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35				40					45				
Ile	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
			50			55					60					
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	
65					70				75					80		
Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	
			85					90						95		
Asn	Tyr	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu			
			100				105					110				

40

【0026】

「M048-D01ポリヌクレオチド」とはM048-D01抗体をコードしている核酸分子を意図する。

50

【0027】

「GAL-FR23ポリペプチド」または「FR23ポリペプチド」（抗体Bとも称する）とは、ブダペスト条約に基づいて2008年8月12日にPTA-9408で寄託された米国特許第9,382,324号で説明されるハイブリドーマによって産生される、FGFR2に特異的に結合する抗体に対する少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する抗体またはその抗原結合断片を意図する。

【0028】

「GAL-FR23ポリヌクレオチド」とはGAL-FR23抗体をコードしている核酸分子を意図する。

【0029】

「10164ポリペプチド」（抗体Cとも称する）とは、米国特許第9,498,532号およびWO2014163714A2に記載の、FGFR2に特異的に結合する10164の抗体配列に対する少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する抗体またはその抗原結合断片を意図する。複数の態様において、前記抗体またはその抗原結合断片は10164の抗体配列に対する少なくとも約90%、93%、95%、98%、99%、またはそれより高いアミノ酸配列同一性を有する。

【0030】

FGFR__10164

重鎖

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYALSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKI
DGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAPDRSPSDSSAF
AIWGQGTINLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

軽鎖

DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGSQYVDWYQQKPGQAPFVLYDDNDRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDSLQVVEGGGKLTFLVLP
KAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS
KQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【0031】

「10164ポリヌクレオチド」とはGAL-FR23抗体をコードしている核酸分子を意図する。

【0032】

「2B 1.3.12ポリペプチド」（抗体Dとも称する）とは、米国特許第10,208,120号で説明される、FGFR2に特異的に結合する2B 1.3.12の配列に対する少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する抗体またはその抗原結合断片を意図する。複数の態様において、前記抗体またはその抗原結合断片は2B 1.3.12の抗体配列に対する少なくとも約90%、93%、95%、98%、99%、またはそれより高いアミノ酸配列同一性を有する。

【0033】

2B.1.3.12重鎖、アミノ酸

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFTSTGISWVRQAPGKGLEWVGRTHLGDGSTNYADSVKGRF
 TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYGIYDITYDMYTEYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 L DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

2B.1.3.12 軽鎖、アミノ酸

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTTCRASQDVDTSLAWYKQKPGKAPKLLIYSASFYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYA
 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0034】

「2B 1.3.12 ポリヌクレオチド」とは2B 1.3.12 抗体をコードしている核酸分子を意図する。

20

【0035】

「HuGal-FR21 ポリペプチド」または「FR21」（抗体Eとも称する）とは、米国特許第9,382,324号で説明される、FGFR2に特異的に結合するGAL-FR21の抗体配列に対する少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する抗体またはその抗原結合断片を意図する。複数の態様において、前記抗体またはその抗原結合断片はGAL-FR21またはHuGal-Fr21の抗体配列に対する少なくとも約90%、93%、95%、98%、99%、またはそれより高いアミノ酸配列同一性を有する。一態様において、抗体GAL-FR21は、ブダペスト条約に基づいて2008年11月6日にPTA-9586で、American Type Culture Collection、P.O.Box 1549 Manassas, Va.20108に寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体（mAB）を含む。HuGal-Fr21は以下の配列を含む。

30

mAB HuGal-FR21の軽鎖可変領域:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

40

mAB HuGal-FR21の重鎖可変領域:

50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr
 Asn Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 Gly Ser Ile Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 Ser Ser

10

【0036】

「HuGAL-FR21ポリヌクレオチド」とはHuGAL-FR21抗体をコードしている核酸分子を意図する。

【0037】

「12433ポリペプチド」（抗体Fとも称する）とは、米国特許出願公開第20190345250で説明される、FGFR2に特異的に結合する12433の抗体配列に対する少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する抗体またはその抗原結合断片を意図する。複数の態様において、前記抗体またはその抗原結合断片は12433の抗体配列に対する少なくとも約90%、93%、95%、98%、99%、またはそれより高いアミノ酸配列同一性を有する。抗体FであるNo.12433は米国特許出願公開第20190345250号の表1に記載されている。抗体12433は以下の例示的な配列を含む：

20

HCDR1 NYIIH(Kabat); HCDR2 AIYPDNSDTTYSFSFQG; HCDR3 GADI; LCDR1
 RASQDIDPYLSN, LCDR2 DASNLQS, LCDR3 QQTTSHPYT

。

【0038】

「12433ポリヌクレオチド」とは12433抗体をコードしている核酸分子を意図する。

【0039】

用語「抗原結合断片」は、本明細書において使用する場合、標的抗原に特異的に結合する能力を保持している、抗体の1つまたは複数の断片を示す。抗体の抗原結合機能は完全長の抗体の複数の断片によって遂行され得る。抗体断片はFab、F(ab')₂、scFv、SMIP、ダイアボディ、トリアボディ、アフイボディ、ナノボディ、アプタマー、またはドメイン抗体であり得る。抗体の「抗原結合断片」という用語に包含される結合断片の例としては、限定するわけではないが：(i) V_L、V_H、C_L、およびC_{H1}ドメインからなる一価の断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片；(iii) V_HドメインおよびC_{H1}ドメインからなるFd断片；(iv) 単一の抗体アームのV_LドメインおよびV_HドメインからなるFv断片、(v) V_HドメインおよびV_Lドメインを含むdAb；(vi) V_HドメインからなるdAb断片 (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)；(vii) V_HドメインまたはV_LドメインからなるdAb；(viii) 単離された相補性決定領域 (CDR)；ならびに (ix) 任意で合成リンカーによって連結されていてもよい2つまたはそれより多くの単離されたCDRの組合せが挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインV_LとV_Hは別々の遺伝子にコードされているが、これらを、組換え法を用いて、V_L領域とV_H領域がペアになって一価の分子を形成している単一のタンパク質鎖にすることを可能にするリンカーによって一体にしてもよい。(単鎖Fv (scFv) として公知；例えば、Bird et al., Science 242:423-426, 1988およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988を参照のこと)。これらの抗体断片は、当業者に公知の慣用的な手法を用いて得られ得、断片は有用性について、インタクトな抗体と同じ様式でスクリーニングされ得る。抗原結合断片は、組換えDNA手法、インタクトな免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によ

30

40

50

って、またはいくつかの態様では、当技術分野において公知の化学的ペプチド合成手順によって作製され得る。いくつかの態様において、合成リンカーによって連結された、二重パラトープ抗体の抗原結合断片（例えば、Fab'、F(ab')₂、Fab、scFab、Fv、rlgG、およびscFv断片）を提供する。

【0040】

「変更」とは、標準的な当技術分野で公知の方法、例えば本明細書に記載のものによって検出されるような、遺伝子またはポリペプチドの構造、発現レベル、または活性の変化（増大または低減）を意図する。本明細書において使用する場合、変更は、発現または活性のレベルの10%の変化、発現または活性のレベルの25%の変化、40%の変化、および50%、またはそれより大きい変化を含む。いくつかの態様において、二重パラトープ抗体の変更は、標的タンパク質に対する結合、安定性、発現、または活性を向上させる配列変更である。別の態様において、変更は、本明細書に記載の二重パラトープ抗体の結合と関連しているFGFR2活性の低下を伴う。

10

【0041】

「アナログ」とは、同一ではないが、同様の機能的または構造的特色を有する分子を意図する。例えば、ポリペプチドアナログは、対応する天然に存在するポリペプチドの生物学的活性を保持しているが、天然に存在するポリペプチドと比べて前記アナログの機能を向上させる特定の生化学的改変を有する。このような生化学的改変により、例えばリガンド結合が変更されることなく、アナログのプロテアーゼ抵抗性、膜透過性または半減期が高まり得る。アナログは非天然のアミノ酸を含み得る。また、元の抗体の活性を保持するかまたは向上させている二重パラトープ抗体のアナログを提供する。

20

【0042】

本明細書において使用する場合、用語「二重パラトープ抗体」は、例えば、単一の標的（例えば、ポリペプチド）上の2つの異なるエピトープに結合することができる抗体を示す。一態様において、本明細書に記載のような二重パラトープ抗体の一方の結合特異性は、FGFR2の細胞外ドメイン内に存在する3つの免疫グロブリン様ドメイン（IgI、IgII、およびIgIII）のうちの第1のものに存在するエピトープに対するものであり、第2の結合特異性は、第2または第3の免疫グロブリン様ドメインに対するものである。別の態様において、第1の結合特異性は、FGFR2の第2の免疫グロブリン様ドメインに対するものであり、第2の結合特異性は第3の免疫グロブリン様ドメインに対するものである。別の態様において、本明細書に記載のような二重パラトープ抗体は、シグナルペプチド（SP）上に存在するエピトープおよび/またはFGFR2の第2もしくは第3の免疫グロブリン様ドメイン（すなわち、Ig2もしくはIg3）ドメイン内に存在するエピトープに対するものである。種々の態様において、本明細書に記載のような二重パラトープ抗体はこのようなエピトープの組合せに対するものである。例えば、SPおよびIg1、Ig2、もしくはIg3に対するか、またはIg1およびIg2もしくはIg3に対するか；またはIg2およびIg3に対する。

30

【0043】

本開示において、「～を含む（comprises）」、「～を含む（comprising）」、「～を含む（containing）」、および「～を有する（having）」などは、これらについて米国特許法に示された意味を有し得、「～を含む（includes）」、「～を含む（including）」などを意味し得；「本質的に～からなる（consisting essentially of）」または「本質的に～からなる（consists essentially）」も同様に、米国特許法に帰属する意味を有し、前記用語はオープンエンドであり、記載のものだけではない存在を許容するが、記載のものの基本的な特徴または新規な特徴が記載のものだけではない前記存在によって変化しないものとし、先行技術の態様は除外する。

40

【0044】

本明細書において使用する場合、用語「相補性決定領域」（CDR）は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの両方にみられる超可変領域を示す。可変ドメインのより高度に保存されている部分はフレームワーク領域（FR）と称される。当技術分野において認識されているように、抗体の超可変領域であると示さるアミノ酸位置は、当技術分野におい

50

て公知の状況および種々の規定に応じて異なり得る。可変ドメイン内のいくつかの位置は、このような位置が、ある設定基準では超可変領域内であるとみなされ得るが、異なる設定基準では超可変領域外であるとみなされるという点で、ハイブリッドな超可変位置とみなされ得る。また、これらの位置のうちの1つまたは複数が、拡張された超可変領域内にみられる場合もあり得る。種々の局面および態様において、これらのハイブリッドな超可変位置内に改変を含む抗体を提供する。天然状態の重鎖および軽鎖の可変ドメインの各々は、主としてβシート構成をとる4つのフレームワーク領域を含み、フレームワーク領域は3つのCDRと連結されており、CDRは、前記βシート構造と連結されており、かつ一部の場合では前記βシート構造の一部を形成するループを形成している。各鎖内のCDRはFR領域により、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順番で近接して一体に保持されており、他方の抗体鎖のCDRとともに抗体の標的結合部位の形成に寄与する（Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest（米国立保健研究所、Bethesda, Md. 1987を参照のこと；参照により本明細書に組み入れられる）。本明細書において使用する場合、免疫グロブリンアミノ酸残基のナンバリングは、特に記載のない限り、Kabat et alの免疫グロブリンアミノ酸残基ナンバリングシステムに従って行なう。

10

【0045】

「検出する」とは、検出される被検物質の有無または量の確認を示す。いくつかの態様において、被検物質は抗原、エピトープ、またはその断片である。一態様において、用語「検出する」とは、関心対象の作用物質に対する抗体の結合を検出することを示す。

20

【0046】

「検出可能な標識」とは、関心対象の分子に連結されると、前記分子が分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出可能になる組成物を意図する。例えば、有用な標識としては、放射性同位体、磁気ビーズ、金属製ビーズ、コロイド粒子、蛍光性色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、ELISAにおいて一般的に使用されるような）、ビオチン、ジゴキシゲニン、またはハプテンが挙げられる。いくつかの態様において、本明細書に記載のような抗体は、検出可能な標識に直接または間接的に連結される。

【0047】

「疾患」とは、細胞、組織、または器官の正常な機能が障害または妨害される任意の病態または障害を意図する。疾患の例としては、がん（例えば、CCA、子宮内膜がん、黒色腫、食道がん、膀胱がん、乳がん、および肺がん）ならびに異常なFGFR2活性と関連している他の過剰増殖性障害が挙げられる。

30

【0048】

「有効量」とは、無処置の患者と比べて疾患の症状を寛解させるために必要とされる作用物質の量を意図する。疾患の治療的処置のための方法を実施するために使用される1つまたは複数の活性化合物の有効量は、投与様式、対象の年齢、体重、および一般健康状態に応じて異なる。最終的には、担当の医師または獣医が適切な量および投薬量レジメンを決定する。このような量は「有効」量と称される。いくつかの態様において、作用物質の有効量は、FGFR2への結合を阻止するため、またはFGFR2活性を低下させるために必要とされる二重パラトープ抗体量である。

40

【0049】

本明細書において使用する場合、用語「内因性の」とは、分子（例えば、ポリペプチド、核酸、または補因子）が特定の生物体（例えば、ヒト）に、または生物体内の特定の場所（例えば、器官、組織、または細胞、例えばヒト細胞）内に天然状態でみられることであると説明される。

【0050】

本明細書において使用する場合、用語「外来性の」とは、分子（例えば、ポリペプチド、核酸、または補因子）が特定の生物体（例えば、ヒト）に、または生物体内の特定の場所（例えば、器官、組織、または細胞、例えばヒト細胞）内に天然状態ではみられないこ

50

とであると説明される。外来性物質としては、生物体にとって、または生物体から抽出された培養物にとって外部の供給源から得られるものが挙げられる。

【0051】

「線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）」とは、FGFリガンドに結合する受容体を意図し、前記結合により典型的にはチロシンキナーゼ活性が誘導される。例示的なFGFRとしては、FGFR1、FGFR2、FGFR2 α IIb、FGFR3、およびFGFR4が挙げられる。

【0052】

用語「FGFR2」は、受容体型チロシンキナーゼスーパーファミリーのメンバーである線維芽細胞増殖因子受容体2を示す。FGFR2の核酸配列およびアミノ酸配列は公知であり、GenBankアクセッション番号NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2において公表されている。

【0053】

FGFR2の例示的なアミノ酸配列はNP_000132において示され、これを以下に複写する。

```

1 mvswgrficl vvtmatlsi arpsfslved ttlepeeppt kyqisqpevy vaapgeslev
61 rcllkdaavi swtkdgvhlq pnnrtvllige ylkikgatpr dsglyactas rtvdsetwyf
121 mvnvtdaiss gddedddtdga edfvsensnn krapywtnte kmekrlhavp aantvkfrcp
181 aggnpmpmtmr wlkngefkq ehriggykvr nqhwslimes vvpsdkgnyt cvveneygsi
241 nhtyhldvve rsphrpilqa glpanastvv ggdvefvckv ysdaqphiqw ikhvekngsk
301 ygpdglpylk vikaagvntt dkeievlyir nvtfedagey tclagnsigi sfhsawltvl
361 papgrekeit aspdyleiai ycigvfliac mvvtvilcrm knntkkpdfs sqpavhkltk
421 riplrrrqvtv saessssmns ntplvrittr lsstadtpml agvseyelpe dpkwefprdk
481 ltlgkplgeg cfigqvmaea vgidkdkpke avtvavkmlk ddatekdlsd lvsememmkm
541 igkhkniinl lgactqdgpl yviveyaskg nlreylrarr ppgmeysydi nrvpeeqltf
601 kdlsvctyql argmeylasq kcihrdlaar nvlvtennvm kiadfglard innidyykkt
661 tngrlpvkwm apealfdrvy thqsdvwsfg vlmweiftlg gspypgipve elfklkkehgh
721 rmdkpanctn elymmmrdcw havpsqrptf kqlvedldri ltlttneeyl dlsqpleqys
781 psypdtrssc ssgddsvfsp dpmpyepclp qyphingsvk t

```

【0054】

構造的に、FGFR2アミノ酸配列は、シグナルペプチド、少なくとも1つまたは複数の免疫グロブリン（Ig）様ドメイン、酸性ボックス、膜貫通ドメイン、および分割されたチロシンキナーゼドメインを有する受容体型チロシンキナーゼタンパク質であり、その全長において、GenBankアクセッション番号NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2のアミノ酸配列との少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。構造的に、FGFR2核酸配列は、その全長において、GenBankアクセッション番号NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2の核酸配列との少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。FGFR2のシグナルペプチドは保持されていてもまたは切断除去されていてもよい。

【0055】

「FGFR2活性」とはチロシンキナーゼ活性を意図する。

【0056】

本明細書において使用する場合、用語「フレームワーク領域」または「FW領域」は、CDRの近傍にあるアミノ酸残基を包含している。FW領域残基は、中でも例えば、ヒト抗体、齧歯類由来の抗体（例えば、マウス抗体）、ヒト化抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、抗体断片（例えば、Fab断片）、単鎖抗体断片（例えば、scFv断片）、抗体ドメイン、および二重特異性抗体に存在し得る。

【0057】

「断片」とはポリペプチドまたは核酸分子の一部を意図する。この部分は、参照の核酸分子またはポリペプチドの全長の好ましくは少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を含む。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90あるいは100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000個のヌクレオチドまたはアミノ酸を含み得る。

【0058】

本明細書において使用する場合、用語「融合タンパク質」または単に「融合体」は、共有結合によって別の分子に連結されているタンパク質を示す。融合タンパク質は、例えば、あるタンパク質のN末端と別のタンパク質のC末端間のアミド結合形成反応によって化学合成することができる。あるいはまた、別のタンパク質に共有結合されたタンパク質を含む融合タンパク質を細胞（例えば、真核生物細胞または原核生物細胞）内で、前記融合タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを例えばベクターまたは前記細胞のゲノムで発現させることによって組換え発現させてもよい。融合タンパク質は、リンカーに共有結合されており、これがさらに別の分子に共有結合されているタンパク質を含み得る。融合タンパク質の形成のために使用され得るリンカーの例としては、ペプチド含有リンカー、例えば天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を含むものが挙げられる。いくつかの態様において、リンカー内にD-アミノ酸を含めることが望ましい場合がある得、これは、この残基が天然に存在するタンパク質内には存在せず、したがって、内因性プロテアーゼによる分解に対してより抵抗性となるためである。リンカーは、当技術分野において周知のさまざまな戦略を用いて調製され得、リンカーの反応性成分に応じて、酵素による加水分解、光分解、酸性条件下での加水分解、塩基性条件下での加水分解、酸化、ジスルフィド還元、求核切断、または有機金属による切断によって切断され得る（Leriche et al., 2012, Bioorg. Med. Chem., 20:571-582）。例示的なFGFR2融合タンパク質は、ゲノム再編成が起こったがん中存在する。このような融合タンパク質は、当技術分野において公知であり、かつ本明細書に記載の方法および配列を用いて組換え発現させることができる。

【0059】

本明細書において使用する場合、用語「ヒト抗体」は、そのタンパク質の実質的にどの部分（例えば、CDR、フレームワーク、 C_L 、 C_H ドメイン（例えば、 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} ）、ヒンジ、（ V_L 、 V_H ））もヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、軽微にすぎない配列の変化または多様性を有する抗体を示す。ヒト抗体はヒト細胞内で（例えば、組換え発現によって）、あるいは機能的に再編成されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および/または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核生物もしくは真核生物（例えば、酵母）の細胞によって産生させることができる。さらに、ヒト抗体が一本鎖抗体である場合、これは、天然状態のヒト抗体にはみられないリンカーペプチドを含み得る。例えば、Fvは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域を連結するリンカーペプチド、例えば2～約8個のグリシンまたは他のアミノ酸残基を含み得る。このようなリンカーペプチドはヒト起源のものであるとみなされる。ヒト抗体は、当技術分野において公知のさまざまな方法、例えばヒト免疫グロブリン配列から得た抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ法によって作製され得る。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号;ならびにPCT出願WO1998/46645;同WO1998/50433;同WO1998/24893;同WO1998/16654;同WO1996/34096;同WO1996/33735;および同WO1991/1

0741を参照のこと;参照により本明細書に組み入れられる。また、ヒト抗体を、機能性の内因性免疫グロブリンを発現することはできないがヒト免疫グロブリン遺伝子は発現することができるトランスジェニックマウスを用いて産生させることもできる。例えば、PCT出願W098/24893;同W092/01047;同W096/34096;同W096/33735;米国特許第5,413,923号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,569,825号;同第5,661,016号;同第5,545,806号;同第5,814,318号;同第5,885,793号;同第5,916,771号;および同第5,939,598号を参照のこと;参照により本明細書に組み入れられる。

【0060】

本明細書において使用する場合、用語「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、もしくは抗体の他の標的結合サブドメイン）である形態の非ヒト（例えば、マウス）抗体を示す。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含み、ここで、CDR領域の全部または実質的に全部は非ヒト免疫グロブリンのものに相当する。また、FR領域の全部または実質的に全部はヒト免疫グロブリン配列のものであり得る。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものの少なくとも一部分を含んでいてもよい。抗体のヒト化の方法は当技術分野において公知である。例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-7, 1988;米国特許第5,530,101号;同第5,585,089号;同第5,693,761号;同第5,693,762号;ならびにQueen et al.に対する米国特許第6,180,370号;EP239400;PCT出願W091/09967;米国特許第5,225,539号;EP592106;およびEP519596を参照のこと;参照により本明細書に組み入れられる。

【0061】

「ハイブリダイゼーション」は、相補的な核酸塩基間のワトソン・クリック、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型の水素結合形成であり得る水素結合形成を意味する。例えば、アデニンとチミンは、水素結合の形成によって対合する相補的な核酸塩基である。

【0062】

用語「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」とは、物質が、その天然状態で見たとき通常、付随している成分からさまざまな度合いで離れていることを示す。「単離する」とは、元の供給源または環境からのある度合いの分離を表す。「精製する」とは、単離よりも高度であるある度合いの分離を表す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、任意の不純物が著しく、前記タンパク質の生物学的特性に影響すること、他の有害な帰結を引き起こすこともないように、十分に他の物質から離れている。すなわち、いくつかの局面および態様の核酸またはペプチドは、細胞性物質、ウイルス性物質、または組換えDNA手法によって産生させた場合は培養培地、または化学合成した場合は化学薬品前駆体もしくは他の化学薬品が実質的に無含有ならば精製されている。純度および均一性は典型的には、分析化学手法、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを用いて測定される。用語「精製された」とは、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲル内に本質的に1つのバンドをもたらしことを表し得る。修飾、例えばリン酸化またはグリコシル化に供され得るタンパク質では、異なる修飾によって異なる単離されたタンパク質が生じ得、これらは別々に精製され得る。

【0063】

「単離されたポリヌクレオチド」とは、本明細書におけるいくつかの局面および態様の核酸分子が由来する生物体の天然に存在するゲノム内では遺伝子に隣接する遺伝子から離れている核酸（例えば、DNA）を意図する。したがって、この用語は、例えば、ベクター内;自律複製プラスミドもしくはウイルス内;または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA内に組み込まれた組換えDNA;あるいは他の配列と独立した別個の分子（例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼによる消化によって生成したcDNAまたはゲノム断片もしくはcDNA断片）として存在する組換えDNAを包含する。また、この用語は、DNA

分子から転写されたRNA分子ならびに追加のポリペプチド配列をコードしているハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも包含する。

【0064】

「単離されたポリペプチド」とは、天然状態では付随する成分から分離されているいくつかの局面および態様のポリペプチドを意図する。典型的には、ポリペプチドは、天然状態では会合しているタンパク質および天然に存在する有機分子を少なくとも60%重量含まない場合、単離されている。好ましくは、調製物は、少なくとも75%重量、より好ましくは少なくとも90%重量、最も好ましくは少なくとも99%重量が本明細書におけるいくつかの局面および態様のポリペプチドである。本明細書におけるいくつかの局面および態様の単離されたポリペプチドは、例えば、天然の供給源からの抽出、このようなポリペプチドをコードしている組換え核酸の発現;またはタンパク質の化学合成によって得られ得る。純度は、任意の適切な方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定され得る。

10

【0065】

用語「ノブ・イントゥ・ホール」または「KnH」技術は、本明細書において使用する場合、2つのポリペプチドを、突出部（ノブ）を一方のポリペプチド内に、および空洞部（ホール）を他方のポリペプチド内に、これらが相互作用する境界面にて導入することによってインビトロまたはインビボで一体にするペアリングを指向する技術を示す。例えば、KnHは抗体のFc:Fc結合境界面、CL:CH1境界面またはVH/VL境界面において導入されている（例えば、US2007/0178552、WO96/027011、WO98/050431、およびZhu et al. (1997) Protein Science 6:781-788）。これは、二重パラトープ抗体の製造の際に2つの異なる重鎖を一体にするペアリングの駆動において特に有用である。例えば、Fc領域内にKnHを有する二重パラトープ抗体は、各Fc領域に連結された可変シングルドメインをさらに含み得るか、または同様の軽鎖ドメインもしくは異なる軽鎖ドメインとペアリングされる異なる重鎖可変ドメインをさらに含み得る。また、KnH技術は、2つの異なる受容体細胞外ドメインを一体にペアリングするため、または異なる標的認識配列を含む任意の他のポリペプチド配列（例えば、アフィボディ、ペプチボディおよび他のFc融合体など）をペアリングするためにも使用され得る。

20

【0066】

二重パラトープ抗体は、KnH技術に依存しない方法を使用しても得られる。Labrijn, et al. (Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1, Nature Protocols 9:2450-2463, 2014) には、制御されたFabアーム交換 (controlled Fab-arm exchange) (cFAE) が記載されており、これは、二重特異性IgG1 (bsIgG1) および二重パラトープ抗体を作製するための使いやすい方法である。このプロトコルは、(i) CH3ドメイン内にシングルマッチング点変異を含む2つの親IgG1の別々の発現; (ii) 半分の分子の組換えを可能にするインビトロ許容酸化還元条件下での親IgG1の混合; (iii) 鎖間ジスルフィド結合の再酸化を可能にするための還元剤の除去;ならびに (iv) クロマトグラフィーベースまたは質量分析 (MS) ベースの方法を用いた交換効率および最終生成物の解析を含む。このプロトコルにより、通常のIgGの構造、特徴、および品質特性を有するbsAbが、ペンチスケール（数マイクログラム〜数ミリグラム）および大規模製造（数キログラム）のモデリングのためにデザインされるミニバイオリアクタースケール（数ミリグラム〜数グラム）の両方において作製される。良質の精製タンパク質で始めると、決まって2〜3日以内（品質管理を含む）に≥95%の交換効率が見られ得る。いくつかの態様において、2つの親IgG1は、CH3:CH3境界面において、いずれのIgG1に1つ、マッチング点変異、すなわち、それぞれK409RおよびF405L (EUナンバリング規則) を含む。

30

40

【0067】

特定の一態様において、Labrijn, et al. (Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange, PNAS. 110:5145-5150, 2013) には、親抗体ペアと比べて卓越したインビボ活性を示すHER2×CD3 (T細胞動員) bs

50

AbおよびHER2×HER2（デュアルエピトープターゲティング）bsAbを用いた概念実証試験が記載されている。前述のLabrijnの刊行物の各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0068】

二重パラトープ抗体を作製するのに有用な方法は、例えば米国特許第9,212,230号、同第9,150,663号、同第10,344,050号で説明されており、各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0069】

本明細書において使用する場合、ポリヌクレオチド断片との関連における用語「機能的に連結される」は、2つのポリヌクレオチド断片が、前記2つのポリヌクレオチド断片にコードされているアミノ酸配列がインフレームのままとなるように連結されていることを意味していることを意図する。

【0070】

「低減される」とは少なくとも10%、25%、50%、75%、または100%のマイナスの変更を意図する。

【0071】

「参照」とは標準状態または対照条件を意図する。いくつかの態様において、腫瘍細胞は本明細書に記載の抗体に接触され、前記細胞に対する前記抗体の抗原との結合の効果が、前記抗体と接触させていない対応する参照細胞と比較して測定される。いくつかの態様において、参照は、対照細胞において観察される増殖、細胞生存、または細胞死である。

【0072】

「参照配列」は、配列比較のための基準として使用される規定の配列である。参照配列は、指定された配列のサブセットまたは全体;例えば、完全長のcDNAもしくは遺伝子配列のセグメントまたは完全なcDNAもしくは遺伝子配列であり得る。ポリペプチドでは、参照ポリペプチド配列の長さは一般的に少なくとも約16個のアミノ酸、好ましくは少なくとも約20個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約25個のアミノ酸、さらにより好ましくは約35個のアミノ酸、約50個のアミノ酸、または約100個のアミノ酸である。核酸では、参照核酸配列の長さは一般的に少なくとも約50個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約60個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約75個のヌクレオチド、さらにより好ましくは約100個のヌクレオチドもしくは約300個のヌクレオチド、または任意のその前後の整数もしくはその間の整数である。

【0073】

本明細書において使用する場合、用語「scFv」は、抗体由来の重鎖の可変ドメインと軽鎖の可変ドメインが連結されていて1つの鎖を形成している単鎖Fv抗体を示す。scFv断片は、リンカーによって分離されている抗体軽鎖の可変領域（VL）（例えば、CDR-L1、CDR-L2、および/またはCDR-L3）と抗体重鎖の可変領域（VH）（例えば、CDR-H1、CDR-H2、および/またはCDR-H3）を含む単一のポリペプチド鎖を構成している。scFv断片のVL領域とVH領域を連結するリンカーは、タンパク質を構成するアミノ酸で構成されたペプチドリinkerであり得る。タンパク質分解性の分解に対するscFv断片の抵抗性が高まるような代替リンカー（例えば、D-アミノ酸を含むリンカー）、scFv断片の可溶性を向上させるための代替リンカー（例えば、親水性リンカー、例えばポリエチレングリコール含有リンカーもしくはグリシン残基とセリン残基の反復を含むポリペプチド）、前記分子の生物学的安定性を改善するための代替リンカー（例えば、分子内ジスルフィド結合もしくは分子間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むリンカー）、またはscFv断片の免疫原性を減弱させるための代替リンカー（例えば、グリコシル化部位を含むリンカー）を使用してもよい。scFv分子は当技術分野において公知であり、例えば米国特許第5,892,019号、Flo et al., (Gene 77:51,1989); Bird et al., (Science 242:423,1988); Pantoliano et al., (Biochemistry 30:10117,1991); Milenic et al., (Cancer Research 51:6363,1991); および Takkinen et al., (Protein Engineering 4:837,1991) に記載されている。scFv分子のVLドメ

インおよびVHドメインは1つまたは複数の抗体分子に由来し得る。また、当業者には、本明細書におけるいくつかの局面および態様のscFv分子の可変領域は、前記可変領域が由来する抗体分子とアミノ酸配列が異なるように改変されてもよいことが理解されよう。例えば、一態様において、アミノ酸残基の保存的置換または変化をもたらすヌクレオチドまたはアミノ酸の置換が行なわれ得る（例えば、CDRおよび/またはフレームワーク残基において）。代替的または付加的に、抗原結合を最適化するための変異がCDRのアミノ酸残基に対して、当技術分野で認知されている手法を用いて行なわれる。scFv断片は、例えばWO2011/084714に記載されており;参照により本明細書に組み入れられる。

【0074】

「特異的に結合する」とは、ポリペプチドまたは抗体が、本明細書におけるいくつかの局面および態様のポリペプチドを天然状態で含む試料中、例えば生物学的試料中の関心対象のポリペプチド（例えばFGFR、例えばFGFR2）を認識して結合するが、他の分子は実質的に認識および結合しないことを意図する。抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片は、前記抗原に100 nM未満の K_D で結合する。例えば、抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片は、前記抗原に最大100 nMまで（例えば、1 pM～100 nM）の K_D で結合する。特定の抗原またはそのエピトープに対する特異的結合を示さない抗体またはその抗原結合断片は、前記特定の抗原またはそのエピトープに対して100 nMより大きい（例えば500 nMより大きい、1 μ M、100 μ M、500 μ M、または1 mMの） K_D を示す。さまざまなイムノアッセイ形式が、特定のタンパク質または糖鎖と特異的免疫反応性の抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイが、タンパク質または糖鎖と特異的免疫反応性の抗体を選択するために常套的に使用される。特異的免疫反応性を調べるために使用され得るイムノアッセイの形式および条件の記載については、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1988) および Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1999) を参照のこと。

【0075】

本明細書におけるいくつかの局面および態様の方法に有用な核酸分子には、本明細書におけるいくつかの局面および態様のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が包含される。このような核酸分子は内因性の核酸配列と100%同一である必要はないが、典型的には実質的な同一性を示す。内因性の配列に対して「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも一方の鎖とハイブリダイズすることができる。本明細書におけるいくつかの局面および態様の方法に有用な核酸分子には、本明細書におけるいくつかの局面および態様のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が包含される。このような核酸分子は、内因性の核酸配列と100%同一である必要はないが、典型的には実質的な同一性を示す。内因性の配列に対して「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも一方の鎖とハイブリダイズすることができる。「ハイブリダイズする」とは、種々のストリンジェンシー条件下での相補的なポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載の遺伝子）間またはその部分間の対合による二本鎖分子の形成を意図する。（例えば、Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A.R. (1987) Methods Enzymol. 152:507を参照のこと）。

【0076】

例えば、ストリンジェントな塩濃度は通常、約750 mM未満のNaClおよび75 mMのクエン酸三ナトリウム、好ましくは約500 mM未満のNaClおよび50 mMのクエン酸三ナトリウム、より好ましくは約250 mM未満のNaClおよび25 mMのクエン酸三ナトリウムである。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは有機溶媒、例えばホルムアミドの非存在下で得られ得、一方、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは少なくとも約35%のホルムアミド、より好ましくは少なくとも約50%のホルムアミドの存在下で得られ得る。ストリンジェントな温度条件としては、通常、少なくとも約30℃の温

度、より好ましくは少なくとも約37℃の温度、最も好ましくは少なくとも約42℃の温度が挙げられる。さまざまな追加のパラメータ、例えばハイブリダイゼーション時間、ターゲット、例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の濃度および担体DNAの包含または除外が当業者に周知である。このような種々の条件を必要に応じて組み合わせることにより種々のストリンジェンシーレベルが得られる。好ましい一態様において、ハイブリダイゼーションは30℃で750 mMのNaCl、75 mMのクエン酸三ナトリウムおよび1% SDS中にて行なわれる。より好ましい一態様では、ハイブリダイゼーションは37℃で500 mMのNaCl、50 mMのクエン酸三ナトリウム、1% SDS、35%のホルムアミドおよび100 µg/mlの変性サケ精子DNA（ssDNA）中にて行なわれる。最も好ましい一態様では、ハイブリダイゼーションは42℃で250 mMのNaCl、25 mMのクエン酸三ナトリウム、1% SDS、50%のホルムアミドおよび200 µg/mlのssDNA中にて行なわれる。このような条件に対する有用な変形は当業者にすぐにわかるであろう。

10

【0077】

ほとんどの適用で、ハイブリダイゼーションの後の洗浄工程もまた、ストリンジェンシーはさまざまである。洗浄ストリンジェンシー条件は塩濃度および温度によって規定され得る。上記のように、洗浄ストリンジェンシーは塩濃度を下げることによって、または温度を上げることによって上げることができる。例えば、洗浄工程のためのストリンジェントな塩濃度は好ましくは約30 mM未満のNaClおよび3 mMのクエン酸三ナトリウム、最も好ましくは約15 mM未満のNaClおよび1.5 mMのクエン酸三ナトリウムである。洗浄工程のためのストリンジェントな温度条件としては、通常、少なくとも約25℃の温度、より好ましくは少なくとも約42℃の温度、さらにより好ましくは少なくとも約68℃の温度が挙げられる。好ましい一態様において、洗浄工程は25℃で30 mMのNaCl、3 mMのクエン酸三ナトリウムおよび0.1% SDS中にて行なわれる。より好ましい一態様では、洗浄工程は42℃で15 mMのNaCl、1.5 mMのクエン酸三ナトリウムおよび0.1% SDS中にて行なわれる。より好ましい一態様では、洗浄工程は68℃で15 mMのNaCl、1.5 mMのクエン酸三ナトリウムおよび0.1% SDS中にて行なわれる。このような条件に対する追加の変形は当業者にすぐにわかるであろう。ハイブリダイゼーション手法は当業者に周知であり、例えばBenton and Davis (Science 196:180,1977); Grunstein and Hogness (Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York,2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques,1987, Academic Press,New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

20

30

【0078】

「実質的に同一」とは、ポリペプチドまたは核酸分子が、参照のアミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか1つ）に対する少なくとも50%の同一性を示すことを意図する。好ましくは、このような配列は、アミノ酸レベルまたは核酸レベルで、比較のために使用される配列と少なくとも60%、より好ましくは80%もしくは85%、より好ましくは90%、95%、またはさらには99%同一である。

40

【0079】

配列同一性は典型的には、配列解析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を用いて測定される。このようなソフトウェアにより、相同性の度合いを種々の置換、欠失、および/または他の改変に割り当てることによって同一の配列または類似の配列をマッチさせる。保存的置換としては典型的には、以下の群: グリシン、アラニン; バリン、イソロイシン、ロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン; セリン、トレオニン; リ

50

シン、アルギニン;およびフェニルアラニン、チロシン内での置換が挙げられる。同一性の度合いの測定に対する例示的なアプローチの1つにおいて、BLASTプログラムは、近縁配列であることを示す $e^{-3} \sim e^{-100}$ の確率スコアを用いて使用され得る。

【0080】

「対象」とは、哺乳動物、例えば限定するわけではないが、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えばウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、またはネコを意図する。

【0081】

本明細書において示す範囲は、前記範囲内のすべての値の省略表現であると理解されたい。例えば、1~50という範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群の任意の数値、数値の組合せ、または部分範囲を含んでいると理解されたい。

10

【0082】

用語「トランスフェクトすること」または「トランスフェクション」は同義的に使用しており、本明細書におけるいくつかの局面および態様によれば、異種核酸（DNA/RNA）を真核生物細胞内、特に酵母細胞内に導入することを意味する。

【0083】

本明細書におけるいくつかの局面および態様によれば、抗体断片は抗体の機能性の部分、例えばFc、Fab、Fab'、Fv、F(ab')₂、scFvを意味していると理解されたい。本明細書におけるいくつかの局面および態様によれば、対応する生物学的活性断片は、抗原に結合することができる抗体の一部、例えばFab、Fab'、Fv、F(ab')₂、およびscFvを意味していると理解されたい。

20

【0084】

本明細書において使用する場合、用語「処置する」、「処置すること」、「処置」などは、障害および/またはそれに伴う症状を低減または寛解させることを示す。排除はしないが、障害または病態の処置は前記障害、病態、またはそれに伴う症状が完全に消失することを必要としないことは認識されると考えられる。

【0085】

本明細書において使用する場合、用語「可変領域CDR」は、配列または構造ベースの方法を用いて同定されるCDRまたは相補性決定領域内のアミノ酸を包含している。本明細書において使用する場合、用語「CDR」または「相補性決定領域」は、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内にみられる不連続の抗原結合部位を示す。このような特定の領域は、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616, 1977およびKabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991; Chothia et al., (J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987) ならびに MacCallum et al., (J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996) に報告されており、ここで、その規定は、互いに比較したとき、オーバーラップするアミノ酸残基またはアミノ酸残基のサブセットを含む。特定の態様において、用語「CDR」は、配列比較に基づいてKabat方式によって規定されるCDRである。

30

40

【0086】

本明細書において使用する場合、用語「ベクター」は、核酸ベクター、例えばDNAベクター、例えばプラスミド、RNAベクター、ウイルス、または他の適切なレプリコン（例えば、ウイルスベクター）を包含している。外来性タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを原核生物細胞または真核生物細胞内に送達するためのさまざまなベクターが開発されている。このような発現ベクターの例は例えばWO1994/11026に開示されており;参照により本明細書に組み入れられる。本明細書におけるいくつかの局面および態様の発現ベクターは、ポリヌクレオチド配列ならびに、例えば、タンパク質の発現および/またはこのようなポリヌクレオチド配列の哺乳動物細胞のゲノム内への組込みのために

50

使用される追加の配列エレメントを含む。本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗体および抗体断片の発現のために使用され得る特定のベクターとしては、遺伝子の転写を指令する調節配列、例えばプロモーター領域およびエンハンサー領域を含むプラスミドが挙げられる。抗体および抗体断片の発現のための他の有用なベクターは、このような遺伝子の翻訳速度を高めるか、または遺伝子の転写により生じるmRNAの安定性もしくは核外輸送を改善する、ポリヌクレオチド配列を含む。このような配列エレメントとしては、例えば、5'および3'非翻訳領域、内部リボソーム進入部位（IRES）、ならびに発現ベクターに担持された遺伝子の効率的な転写を指令するためのポリアデニル化シグナル部位が挙げられる。また、本明細書におけるいくつかの局面および態様の発現ベクターに、このようなベクターを含む細胞の選択のためのマーカーをコードしているポリヌクレオチドを含めてもよい。好適なマーカーの例としては、抗生物質、例えばアンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、またはノーセオスリシンに対する耐性をコードする遺伝子が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0087】

本明細書において使用する場合、用語「VH」は、抗体の免疫グロブリン重鎖、例えばFv、scFv、またはFabの重鎖の可変領域を示す。「VL」に対する言及は、免疫グロブリン軽鎖、例えばFv、scFv、dsFv、またはFabの軽鎖の可変領域を示す。抗体（Ab）および免疫グロブリン（Ig）は、同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は特定の標的に対する結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体および標的特異性がない他の抗体様分子の両方を包含する。天然状態の抗体および免疫グロブリンは通常、2つの同一の軽（L）鎖と2つの同一の重（H）鎖で構成された、約150,000ダルトンのヘテロ四量体型の糖タンパク質である。天然状態の抗体の各重鎖は、アミノ末端に可変ドメイン（VH）、続いていくつかの定常ドメインを有する。天然状態の抗体の各軽鎖は、アミノ末端に可変ドメイン（VL）およびカルボキシ末端に定常ドメインを有する。

【0088】

明示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用する場合、用語「または/もしくは（or）」は包含的であると理解されたい。明示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用する場合、用語「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」は単数形または複数形であると理解されたい。

【0089】

明示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用する場合、用語「約」は、当技術分野における通常の許容範囲内、例えば平均の2標準偏差以内であると理解されたい。約は、記載の値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内であると理解され得る。文脈から明白でない限り、本明細書に示す数値はすべて、約という用語で修飾されている。

【0090】

本明細書における可変部の任意の定義における列挙した化学基の記載は、任意の単独の基としての前記可変部の定義または列挙した基の組合せとしての前記可変部の定義を含む。本明細書における可変部または局面の一態様の記載は、任意の単独の態様としての前記態様または任意の他の態様もしくはその一部分との組合せでの前記態様を含む。

【0091】

本明細書において提供する任意の組成物または方法は、本明細書において提供するその他の任意の組成物および方法のうちの1つまたは複数と組み合わせることができる。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1A】FGFR2融合タンパク質を示す概略図を示す。

【図1B-1】図1Bは、細胞の集団倍加の定量の3つのグラフを示す。BaF3細胞はFGFR2融合体の形質転換がなされた。BaF3細胞は、FGFR2受容体型チロシンキナーゼドメ

インとホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (PHGDH)、アデノシルホモシステイナーゼ様1 AHCYL1またはBiccファミリーRNA結合タンパク質1 (BICC1) との融合体を発現するレトロウイルスベクターを用いてIL3の存在下または非存在下で形質導入された。IL3枯渇アッセイにおいてFGFR2-AHCYL1およびFGFR2-PHGDH融合体 FGFR2-BICC1 (一部) によりBaF3細胞に対してIL3非依存性増殖がもたらされた。

【図1B-2】図1B-1の説明を参照のこと。

【図1B-3】図1B-1の説明を参照のこと。

【図2-1】図2は、FGFR阻害物質NVP-BGJ398の投薬量の関数としての生存度の定量の3つのグラフを示す。インフィグラチニブとしても公知のNVP-BGJ398は、FDA承認済みの経口投与可能な、FGFR1/2/3に対する選択的FGFR阻害物質である。NVP-BGJ398は、FGFR1/2/3を用いた無細胞アッセイにおいて、それぞれ0.9 nM/1.4 nM/1 nMのIC50を有することが報告されている。データは、FGFR2融合体形質転換BaF3細胞がFGFR阻害物質 (NVP-BGJ398) に対して感受性であることを示す。IC50 (uM) を示す表も示す。

10

【図2-2】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-3】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-4】図2-1の説明を参照のこと。

【図3】図3Aは、FGFR2融合タンパク質を発現しているNIH3T3細胞のフォーカスフォーメーションを示す顕微鏡写真を示す。図3Bは、FGFR2融合体を発現しているNIH3T3細胞の培養物中に存在しているコロニーの数を示すグラフである。このデータは、FGFR2融合体はNIH3T3細胞を形質転換させるのに充分であったことを示す。

20

【図4A】図4A~4Fは、FGFR2細胞外ドメインがFGFR2融合体駆動性細胞増殖および形質転換に重要であること、ならびに患者由来のFGFR2細胞外ドメインの変異によって形質転換能が高まったことを示す模式図、プロット、画像、表、およびグラフを示す。また、図示のように、いくつかの親抗体はECD変異駆動性細胞増殖の阻害に有効であった。図4Aは、FGFR2-BICC1、FGFR2-AHCYL1およびFGFR2-PHGDH融合体が対照と比べて速く増速し、FGFリガンドに応答することを示すグラフである。FGFR2細胞外ドメイン (ECD) は、FGFR2融合体を発現している形質転換NIH3T3細胞の増殖に寄与する。図4Bは、FGFR2-BICC1融合体のIg1、Ig2、Ig3のいずれかまたはIg2とIg3の両方の細胞外ドメインを欠失させたFGFR2-BICC1融合体のECD欠失構築物の図を示す。このような欠失変異型を細胞ベースのアッセイにおいて使用し、発がん性形質転換を引き起こすことに対するFGFR2-BICC1融合体のECDの重要性をNIH3T3およびBaF3細胞において評価した。また、本明細書に記載の抗体が、ECD変異型FGFR2融合体を過剰発現する細胞の増殖を阻害する能力も評価した。図4Cは、形質転換細胞内におけるECD変異型FGFR2融合体の発現レベルを示すプロットを示す。図4Dは、各々の変異型ECD FGFR2-BICC1融合体 (FGFR2-BICC1バリエーション) を有するように形質転換されたNIH3T3細胞の画像、ならびに各々のFGFR2-BICC1バリエーションを有するように前記細胞を形質転換した後の前記バリエーションの形質転換能および増殖効果を示すグラフを示す。図4Dの代表的な画像は、フォーカスフォーメーションアッセイにおいて異なるFGFR2-BICC1バリエーションを有するようにNIH3T3細胞を形質導入したときに形成されたコロニーを示す。アッセイは、各バリエーションについて5連で行なった。図4Eは、胆管がんを有する患者 (例えば、患者1~4 (PT1~PT4)) に由来するFGFR2のECDにおける欠失変異は、形質転換細胞コロニーの写真画像および形成された形質転換されたコロニーの数を示すグラフに示されるように、NIH3T3細胞内に導入されると形質転換能を増大させ、したがって活性化性変異であったことを示す。図4Fは、いくつかの親抗体 (例えば、抗体A~F) が、ECD活性化性欠失変異を有する患者由来のFGFR2を有するように形質転換されている細胞のECD変異駆動性細胞増殖の阻害に有効であったことを示す。図4Fのグラフにおいて、患者1 (図4Fの表に示したとおり) に由来するECD活性化性欠失変異を有するFGFR2を有するように形質転換され、表示した抗体と接触させた細胞を用いたアッセイの結果を左から1番目の四角の組に示し;患者2 (図4Fの表に示したとおり) に由来するEC

30

40

50

D活性化性欠失変異を有するFGFR2を有するように形質転換され、表示した抗体と接触させた細胞を用いたアッセイの結果を左から2番目の四角の組に示し;患者3(図4Fの表に示したとおり)に由来するECD活性化性欠失変異を有するFGFR2を有するように形質転換され、表示した抗体と接触させた細胞を用いたアッセイの結果を左から3番目の四角の組に示し;患者4(図4Fの表に示したとおり)に由来するECD活性化性欠失変異を有するFGFR2を有するように形質転換され、表示した抗体と接触させた細胞を用いたアッセイの結果をグラフの最も右側の四角の組に示す。

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D-1】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D-2】図4Aの説明を参照のこと。

【図4E-1】図4Aの説明を参照のこと。

【図4E-2】図4Aの説明を参照のこと。

【図4F-1】図4Aの説明を参照のこと。

【図4F-2】図4Aの説明を参照のこと。

【図5-1】図5は、FGFR2-BICC1、FGFR2-AHCYL1およびFGFR2-PHGDH融合体がNVP-BGJ398処理に対して感受性であることを示す-これらの融合体がFGFRを介してシグナル伝達することを示すグラフである。FGFR2融合体を有するように形質転換されたNIH3T3細胞はFGFR阻害物質NVP-BGJ398に対して感受性である。

【図5-2】図5-1の説明を参照のこと。

【図6A】FGFリガンド(FGF10)がFGFR2-PHGDH融合体発現BaF3細胞の増殖を増強することを示すグラフである。

【図6B】FGFリガンド(FGF10)がFGFR2-PHGDH融合体発現BaF3細胞の増殖を増強することを示すグラフである。

【図7A-1】図7Aは模式図およびグラフを含む。模式図は、表示した抗体に結合されるFGFR2エピトープを示す。FGFR2細胞外ドメインの抗体に結合される領域としては、シグナルペプチド(SP)ならびに3つの免疫グロブリン様ドメイン(IgI、IgII、およびIgIII)が挙げられる。FGF受容体は、膜貫通ドメイン(TM)および2つのキナーゼドメインもまた含む。図の左に、抗体A~Fを用いたFACS解析の結果を示す一連のヒストグラムを示す。図の右に、GFP陽性である細胞の割合を、図に示した種々のFGFR2ドメインに対する抗体A~Fの抗体濃度の対数の関数として示す。

【図7A-2】図7A-1の説明を参照のこと。

【図7A-3】図7A-1の説明を参照のこと。

【図7B】本明細書において記載され、使用される抗体A~Fの供給元、代替命名表記、および特性を示す表である。一例として、図7Bにおいて、「抗体A」の代替表記は「Bayer」および「M048-D01」であり;「抗体B」の代替表記は「Gal23」および「GAL-FR23」であり;「抗体C」の代替表記は「N10164」、「N10」および「10164」であり;「抗体D」の代替表記は「GE」および「2B 1.3.12」であり;「抗体E」の代替表記は「GA」および「HuGAL-FR21」であり;「抗体F」の代替表記は「N12433」、「N12」、および「12433」である。

【図8】概略図(図7Aに示した)およびFGF10で処置した場合のFGFR2IIb発現BaF3細胞の増殖を示すグラフである。抗FGFR2抗体は、野生型FGFR2bを発現しているBaF3細胞のリガンド依存性刺激を阻止した。FGFR2bは、胆管がんにおいて主に発現されるFGFR2のアイソフォームである。

【図9】抗体Fは、BaF3細胞のFGFR2-PHDGH活性化性融合体に対する阻害活性を有することを示すグラフである。抗体AおよびCならびに程度は低いDはFGFリガンドの非存在下でアゴニスト活性を有する。

【図10】抗体C、D、EおよびFがFGFR2-PHDGH融合体発現BaF3細胞のリガンド刺激性増殖に対する活性を有することを示すグラフである。

【図11A】二重パラトープ抗体の作製を示す。図11Aは、二重パラトープ抗体の作製

10

20

30

40

50

に有用である可能性が高いFGFR2抗体の組合せを示す。親抗FGFR2抗体の組合せにより、細胞（例えば、BaF3）増殖に対する前記抗体の阻害性効果が高まった。

【図11B】二重パラトープ抗体の作製を示す。図11Bは、二重パラトープ抗体の作製のためのデザインを示す。

【図11C】二重パラトープ抗体の作製を示す。図11Cは、二重パラトープ抗体の作製のためのデザインを示す。図11Cは、duobody技術（Genmab）に基づいた二重パラトープ抗体の作製の概略図を示す。一例として、duobody抗体（例えば、IgG1抗体）は、抗体のCH3ドメイン内のマッチした（不安定化性）変異の制御されたFabアーム交換によって作製される。K409RおよびF405Lは、CH3境界面におけるこのような不安定化性変異の一例である。相補的な変異はヘテロ二量体化に好都合である。制御されたFabアーム交換による安定な二重特異性抗体の作製はA.F.Labrijn et al., March 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110 (13): 5145-5150およびA.F.Labrijn et al., May 2017 (online), Nature Scientific Reports, 7: 2476に報告されている。

【図11D-1】二重パラトープ抗体の作製を示す。図11Dは、ホモ二量体型抗体（タグ付けされていないか、またはHis/Hisタグ抗体）を、抗体（二重特異性）の片側の半分のみにHisタグを含むヘテロ二量体型二重パラトープHisタグ抗体から分離して精製するためのニッケル精製を用いた二重特異性抗体の精製を示す。

【図11D-2】図11D-1の説明を参照のこと。

【図11D-3】図11D-1の説明を参照のこと。

【図12】2つのグラフを含む。左のグラフは、FGFR2増幅を有するSNU-16細胞株を用いたFACSによって解析された結合シフトを示す。右のグラフは、種々のGA抗体濃度におけるFGFR2抗体に結合された（GFP+を有する）細胞の割合を示す。以前の試験において、GA抗体は、およそ1 nMのKd (nM) (FACS) を有した。本試験では、抗体Eは1.58 nMのKdを有した。Kdは結合曲線に基づいて計算している。GA抗体（GalaxyのHuGAL-FR21）は米国特許出願公開第20160362496号で説明されている。右のグラフに、陽性蛍光を伴う細胞のパーセントの数値を、Galaxy抗体濃度の対数の関数として示す。

【図13-1】図13は、FACSデータ（上部）および結合%（下部）を示し、これらをKdの計算に使用した。各FACS曲線は異なる濃度を示す。シフトが右側にいくほどAb濃度が高い。

【図13-2】図13-1の説明を参照のこと。

【図13-3】図13-1の説明を参照のこと。

【図13-4】図13-1の説明を参照のこと。

【図13-5】図13-1の説明を参照のこと。

【図14A-1】図14A~14Eは、FGFR2二価抗体はFGFR阻害物質とともに相乗作用してFGFリガンド（FGF10）の非存在下においてFGFR2融合体駆動性細胞増殖を阻害することを示すチャート、アイソボログラム、およびLoeweスコアを示す。図14Aは、0、0.84、1.69、3.39、6.78 μ Mの濃度のFGFR2低分子阻害物質BGJ398（NVP-BGJ398とも称する）（例えば、実施例3参照）と0、5、15、30、40 μ g/mLの濃度の抗FGFR2二価抗体（抗体F）の、FGFR2融合体分子（FGFR2-PHGDH）を過剰発現しているBaF3細胞を用いた細胞ベースのアッセイにおける前記阻害物質および前記抗体での3、4、および5日間の処理後のFGFリガンドの非存在下（-FGF）での相乗効果を示すチャートを示す。図14Aのチャートにおいて、四角および数値の色が薄いほど低い細胞の生存と相関しており、抗体FはFGFの非存在下でBGJ398とともに阻害性効果を示すことを示す。図14B~14Dは、異なる日数におけるFGFR阻害物質と抗FGF2二価抗体の相乗効果を示し、図14Aに示す結果をサポートするアイソボログラムを示す。図14BはBGJ398阻害物質での処理後3日目に対応し；図14CはBGJ398阻害物質での処理後4日目に対応し；図14DはBGJ398阻害物質での処理後5日目に対応する。図14Eは、異なる日数におけるFGFR阻害物質と抗FGF2二価抗体の相乗効果を示し、図14Aに示す結果をサポートするLoeweスコアを示す。結果は、5日間処理した場合、FGF10の非存在下において、

BGJ398が抗体Fとともに相乗作用してFGFR2-PHGDH駆動性BaF3細胞増殖を阻害することを示す。

【図14A-2】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14A-3】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14B-1】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14B-2】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14C-1】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14C-2】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14D-1】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14D-2】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14E-1】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14E-2】図14A-1の説明を参照のこと。

【図14E-3】図14A-1の説明を参照のこと。

【図15A-1】図15A～15Eは、FGFR2二価抗体はFGFR阻害物質とともに相乗作用してFGFリガンド（FGF10）の存在下においてFGFR2融合体駆動性細胞増殖を阻害することを示すチャート、アイソボログラム、およびLoeweスコアを示す。図15Aは、FGFR2低分子阻害物質BGJ398と抗FGFR2二価抗体（抗体D）の、FGFR2融合体分子（FGFR2-PHGDH）を過剰発現しているBaF3細胞を用いた細胞ベースのアッセイにおける前記阻害物質および前記抗体での3、4、および5日間の処理後のFGFリガンドの存在（+FGF）下での相乗効果を示すチャートを示す。図15Aのチャートにおいて、四角および数値の色が薄いほど低い細胞の生存と相関しており、抗体DはFGFの存在下でBGJ398とともに阻害性効果を示すことを示す。図15B～15Dは、異なる日数におけるFGFR阻害物質と抗FGF2二価抗体の相乗効果を示し、図15Aに示す結果をサポートするアイソボログラムを示す。図15BはBGJ398阻害物質での処理後3日目に対応し；図15CはBGJ398阻害物質での処理後4日目に対応し；図15DはBGJ398阻害物質での処理後5日目に対応する。図15Eは、異なる日数におけるFGFR阻害物質と抗FGF2二価抗体の相乗効果を示し、図15Aに示す結果をサポートするLoeweスコアを示す。5日間処理した場合、FGF10の存在下において、BGJ398は抗体Dとともに相乗作用してFGFR2-PHGDH駆動性BaF3細胞増殖を阻害する。一態様において、別のFGFR2融合体、例えばFGFR2-BICC1がNIH3T3細胞、例えばFGFR2-BICC1を過剰発現しているNIH3T3細胞とともに、FGFリガンドありおよびなしでのBGJ398と抗体FおよびDの相乗効果を評価するために使用され得る。

【図15A-2】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15A-3】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15B-1】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15B-2】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15C-1】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15C-2】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15D-1】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15D-2】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15E-1】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15E-2】図15A-1の説明を参照のこと。

【図15E-3】図15A-1の説明を参照のこと。

【図16A】図16A～16Fは、FGFR2の二量体化を測定するためのNANOBIT（登録商標）アッセイの開発に関する模式図、プロット、およびグラフを示す。このようなアッセイは、二重パラトープスクリーニングを、FGFR2の二量体化を破壊する能力についてスクリーニングするために使用される。図16Aは、FGFリガンドがFGFR2のECDに結合することにより生じる受容体二量体化（左）およびFGFR2融合体により生じる受容体二量体化（右）によって示されるように、FGFR2受容体二量体化がNANOBIT（登録商標）アッセイを用いて測定されることを示す。タンパク質間相互作用によってサブユニットが近接して機能性の酵素を形成し、これが明るい発光シグナルを生成する。（図16B）。

図16C（左）は、トランスフェクション後3日目のHEK293T細胞における一過性発現に使用されたFGFR2-WT（野生型）、FGFR2-ACHYL1およびFGFR2-BICC1のNANOBIT（登録商標）発現構築物のウエスタンブロットを示す。図16C（右）は、FGFR2融合体およびFGFR2発現細胞を用いたNANOBIT（登録商標）アッセイの結果のグラフを示す。図16Dは、HEK293T細胞におけるFGFR2融合体の安定発現のために使用されたFGFR2-WT（野生型）、FGFR2-ACHYL1およびFGFR2-BICC1のNANOBIT（登録商標）構築物のブロットを示す。図16Eは、NANOBIT（登録商標）構築物を用いたFGF10リガンドありまたはなしでのNANOBIT（登録商標）アッセイの結果のグラフを示す。図16Fは、FGFR2を発現している安定細胞株を抗体A～F（図7Bにおいて確認されるとおり）に供し、NANOBIT（登録商標）アッセイを行なったアッセイの結果を示す。図16Fの左側のグラフに示されるように、抗体A～Fのうちの特定のものは、FGFR2（FGFR2I11b）を安定的に過剰発現しているBaF3細胞の増殖を阻害した。抗体DをNANOBIT（登録商標）アッセイにおいて使用した（図16Fの右のグラフ）。図16Fの最も右側のグラフに、アッセイにおいてFGFR2 WT（野生型）で生じた発光の倍率を図16Fに示す3つのバーの各セットの左のバーで示し；アッセイにおいてFGFR2+FGF10リガンドで生じた発光の倍率を3つのバーの各セットの真ん中のバーで示し；アッセイにおいて+/-FGF10リガンドの差で生じた発光の倍率を3つのバーの各セットの右のバーで示す。

10

【図16B】図16Aの説明を参照のこと。

【図16C-1】図16Aの説明を参照のこと。

【図16C-2】図16Aの説明を参照のこと。

20

【図16D】図16Aの説明を参照のこと。

【図16E】図16Aの説明を参照のこと。

【図16F-1】図16Aの説明を参照のこと。

【図16F-2】図16Aの説明を参照のこと。

【図17A】図17A～17Cは、二重パラトープ抗体のアビディティを、その親（二価単一特異性）抗体のものと比較するための行なわれた評価に関する概略図および表形式のデータを示す。図17Aは、二価でかつ二重特異性である二重パラトープ抗体はリガンド（FGFR2）に、その親（二価単一特異性）抗体より強固に結合することがわかったこと、およびそのため、FGFR2に対してより強固に結合する二重パラトープ抗体はFGFR2の二量体化の阻止においてより効率的である可能性が高いことを示す。図17Bおよび17Cは、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いて測定された親抗体および二重パラトープ抗体の結合親和性を示す表を示す。表中、ほぼすべての単一特異性の親抗体、すなわちFGFR__B（KD（M）1.6E-08）、FGFR__N__12433（KD（M）7.5E-09）、FGFR__GA（KD（M）7.5E-09）、FGFR__Gal23（KD（M）2.1E-09）、FGFR__N__10164（KD（M）1.7E-09）、およびFGFR__GE__FL（KD（M）9.9E-10）が、結合アッセイにおいて評価された二重パラトープ抗体より低い結合親和性を示した。二重パラトープ抗体の命名は、図7Bの表に示す抗体の説明に基づいている。

30

【図17B】図17Aの説明を参照のこと。

【図17C】図17Aの説明を参照のこと。

【図18A】図18A～18Dは、二重パラトープ抗体が、FGFR2-PHGDH融合体を過剰発現するように分子操作されたBaF3細胞のFGFR2融合体駆動性細胞増殖に影響を及ぼす能力を示すグラフを示す。図18A～18Dに示されるように、二重パラトープ抗体GA/N12、GA/Gal23、Gal23/N12、およびB/N12は、FGFR2-PHGDH融合体（胆管がん患者にみられる）を過剰発現しているBaF3細胞の増殖の阻害において、空のベクターを過剰発現している対照細胞と比べてより効率的かつ強力であった。また、これらの二重パラトープ抗体は、FGFR2-PHGDH融合体を過剰発現しているBaF3細胞の増殖の阻害において、その親抗体と比較してもより効率的であった。二重パラトープ抗体の命名は図7Bに示す親抗体の表記および説明に基づいている。

40

【図18B】図18Aの説明を参照のこと。

【図18C】図18Aの説明を参照のこと。

50

【図18D】図18Aの説明を参照のこと。

【図19A】図19A～19Eは、二重パラトープ抗体が、FGFR2-BICC1融合体を過剰発現するように分子操作されたNIH3T3細胞のFGFR2融合体駆動性細胞増殖に影響を及ぼす能力を示すグラフを示す。図19A～19Eに示されるように、二重パラトープ抗体GE/N10、GE/N12、B/GE、B/GA、およびB/N12は、FGFR2-BICC1融合体（胆管がん患者にみられる）を過剰発現しているNIH3T3細胞の増殖の阻害において、その親抗体と比べてより効率的かつ強力であった。二重パラトープ抗体の命名は図7Bに示す親抗体の表記および説明に基づいている。

【図19B】図19Aの説明を参照のこと。

【図19C】図19Aの説明を参照のこと。

【図19D】図19Aの説明を参照のこと。

【図19E】図19Aの説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0093】

態様の詳細な説明

本明細書において特徴とするのは、FGF受容体（例えば、FGFR2）に特異的に結合してそれを阻害する二重パラトープアンタゴニスト抗体、および胆管がん（CCA）を含むがんの処置のためにこのような抗体を使用する方法である。

【0094】

本明細書に記載の局面および態様は、少なくとも一部において、線維芽細胞増殖因子受容体2（FGFR2）上の2つの異なるエピトープに結合してFGFR2活性を阻害する二重パラトープ抗体を見出したことに基づく。理論に拘束されることを望まないが、本明細書におけるいくつかの局面および態様の二重パラトープ抗体はFGFR2を、FGFR2へのリガンドの結合を阻止することによってだけでなく、FGF受容体間の相互作用/二量体化を立体的に阻止することによっても阻害する。

【0095】

FGFR2の細胞外ドメイン内の相違するエピトープに結合する6つの抗体を使用してFGFR2に対する二重パラトープ抗体を作製する。前記抗体のVH配列およびVL配列を以下に示す。

M048-D01 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGTS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRYNWNHGDWFD P
WGQGTLLTVSS

10

20

30

40

50

M048-D01 VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYENYNRPAG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSWDDSLNYWVFGGGTKLTVLG

HuGAL-FR21 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTTYNVHWVRQAPGQGLEWIGSIYPDNG
DTSYNQNFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFAYWGQGTLLTV
SS

10

HuGAL-FR21 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQGVSN DYAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHSTTPYTFGQGTKLEIK

GAL-FR23 VH

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDFGMNWMKQAPGKGFKWMGWINTST
GESTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCARNSYYGGSYGYWGQ
GTTLTVSS

20

GAL-FR23 VL

DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMKCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK

30

2B 1.3.12 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFTSTGISWVRQAPGKGLEWVGRTHLGDG
STNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYGIYD TYDMYTEY
VMDYWGQGTLLTVSS

2B 1.3.12 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVDTSLAWYKQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIK

40

50

10164 VH

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYALSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKIDG
GTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDRSPSDSSAFAIWG
QGTLVTVSS

10164 VL

DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGSQYVDWYQQKPGQAPVLVIYDDNDRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDSLVSFVFGGGTKLTVLG

10

12433 VH

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIHWVRQMPGKGLEWMGAIYPDNS
DTTYSFSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGADIWGQGTLVTVSS

12433 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDPYLSNWFYQQKPGKAPKLLIYDASNLSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTTSHPHYTFGGGTKVEIK

20

【0096】

この6つの抗体の考えられ得るすべて（すなわち、21通り）の組合せを使用して二重パラトープ抗体を作製する。特定の態様において、前記抗体は、軽鎖と重鎖のペアリングをもたらし特定の変異を含む。他の態様において、二重パラトープ抗体を作出するために DuoBody 技術が使用される。これらの二重パラトープ抗体は結合アッセイ、増殖アッセイおよび二量体化アッセイにおいて試験され、機能的帰結を有する同時結合を可能にするエピトープに結合する抗体が同定される。

30

【0097】

胆管がん

胆管がん（CCA）は、胆道において最も多くみられる原発性悪性腫瘍であり、肝臓において2番目に多くみられる原発性悪性腫瘍である。全体では、CCAは胃腸の全悪性腫瘍の3%を占める。CCAの発生率は過去30年間で高くなっているが、しかしながら、5年生存率は依然としておよそ10%である。その胆道系内の解剖学的部位に基づき、CCAは、肝内CCA（iCCA）、肝門部領域（perihilar）CCA（pCCA）および遠位CCA（dCCA）サブタイプに分類される。増殖因子であるチロシンキナーゼ、例えばFGFR、EGFRおよびEGFR経路の脱制御は、CCAの起始および進行に極めて重要な役割を果たす。MET受容体のリガンドであるHGFは腫瘍の浸潤性および転移を促進させる。CCAではHGFおよびMETの異常な過剰発現が起こり、予後不良と関連している。

40

【0098】

線維芽細胞増殖因子（FGF）およびFGF受容体（FGFR）

FGF経路は、22種類のヒトFGFおよびいくつかの膜貫通受容体型チロシンキナーゼFGFR1～4を含む。FGFシグナル伝達は数多くの生物学的プロセス、例えば増殖、分化、生存、遊走、および血管新生に参与している。FGF-FGFR軸は、FGFが細胞表面上の特定の複合体内のFGFRおよびヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合することにより活性化される。この複合体では、2分子のヘパリン硫酸が2つのFGFに連結しており、2つのFGFR鎖が橋状結合された二量体（2つのFGF、2つのヘパリン、2つのFGFR）になっている。

50

FGFRの二量体化はホモ二量体駆動性である。形成されたら、この複合体はFGFRチロシンキナーゼを活性化し、自己リン酸化をもたらす。FGFRチロシンキナーゼ活性は、細胞の生存および増殖を促進させる細胞内シグナル伝達カスケードを活性化する。Ras-MAPK、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) -プロテインキナーゼAkt/プロテインキナーゼB経路およびSrcはすべて、この細胞内シグナル伝達カスケードにおいて役割を果たしている。

【0099】

異常なFGFRシグナル伝達は多くの場合、発がん性変化をもたらす。FGFRのゲノム変更に活性化性変異、受容体遺伝子の増幅および染色体転座に起因し得る。遺伝子内転座は、FGFRキナーゼドメインに融合された転写因子からなる融合タンパク質の形成をもたらす。その後のFGFRの二量体化および活性化を伴う。ゲノム異常はリガンド非依存性FGFシグナル伝達をもたらす。本明細書に記載のようなFGFR2融合体、例えば限定するわけではないが、FGFR2-PHGDH、FGFR2-AHCYL1およびFGFR2-BICC1は肝内CCAを有する患者の10%~16%で観察されており、細胞の形質転換、異常な細胞成長および発がんの一因となっている可能性がある。

【0100】

本明細書において、FGFR2の細胞外ドメイン内のエピトープに特異的に結合し、FGFR2およびFGFR2融合体の活性を阻害する二重パラトープ抗体を提供する。

【0101】

二重パラトープ抗体の作製およびスクリーニング

FGFR2に特異的に結合する二重パラトープ抗体を提供し、本明細書に記載する。一例において、二重パラトープ抗体はFGFR2に結合してリガンド駆動性の受容体二量体化およびチロシンキナーゼ活性を阻害する。別の態様において、二重パラトープ抗体はFGFR2融合体に結合してリガンド非依存性のチロシンキナーゼ活性を阻害する。別の態様において、二重パラトープ抗体はFGFR2に結合して受容体内在化を加速させ、それにより受容体機能を下方調節する。関心対象のタンパク質に対する抗体を作製するための方法は当技術分野において公知である。

【0102】

動物を抗原で免疫処置すると、多くの個々のモノクローナル抗体の特異性で構成されたポリクローナル抗体応答が生じることによって応答する。このような個々の特異性の総和により、ポリクローナル抗体が非常に多くの異なるアッセイにおいて有用となる。個々のモノクローナル抗体は当初は、個々のB細胞を、ハイブリドーマ技術を用いて不死化することによって単離され (Kohler and Milstein, Nature 256, 495, 2011)、ここで、免疫処置された動物由来のB細胞が骨髓腫細胞と融合される。分子生物学の出現で、関心対象のタンパク質に対する抗体、例えば二重パラトープ抗体を作製するためのインビトロ方法が開発されている。

【0103】

用語「関心対象の抗原」または「標的タンパク質」は本明細書において互換的に使用され、一般的に、抗体によって認識され、特異的に結合される作用物質を示す。

【0104】

抗体は、エピトープに特異的に結合する特定の形状を有するポリペプチド鎖含有分子構造体であり、この場合、1つまたは複数の非共有結合性の相互作用によって前記分子構造体とエピトープとの複合体が安定化される。一態様において、抗体分子は免疫グロブリン (例えば、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD) である。さまざまな供給源、例えばヒト、齧歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌまたは家禽由来の抗体が「抗体」とみなされる。数多くの抗体コード配列が報告されており; 当技術分野において周知の方法によって生成され得るものもある。

【0105】

例えば、抗体、例えば二重パラトープ抗体または抗原結合断片を遺伝子操作によって産生させてもよい。関心対象の抗体コード配列としては、天然状態の配列にコードされるも

10

20

30

40

50

のなればに遺伝コードの縮重のため配列が野生型核酸配列と同一でない核酸にコードされるものが挙げられる。バリエーションポリペプチドはアミノ酸 (aa) の置換、付加または欠失を含み得る。アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換であってもよく、例えばグリコシル化部位を変更するため、または機能に必要でない1つもしくは複数のシステイン残基の置換もしくは欠失によってミスフォールディングを最小限にするために非必須アミノ酸を排除するための置換であってもよい。バリエーションは、タンパク質の特定の領域 (例えば、機能性ドメイン、触媒性アミノ酸残基) の生物学的活性が保持されるように、または前記生物学的活性の向上を有するようにデザインされ得る。また、バリエーションは、本明細書に開示のポリペプチドの断片、特に、生物学的に活性な断片および/または機能性ドメインに相当する断片を含む。クローニングされた遺伝子のインビトロ変異誘発のための手法は公知である。また、本明細書におけるいくつかの局面および態様には、タンパク質分解性の分解に対する抵抗性が改善されるように、または可溶性特性が最適化されるように、もしくは治療用物質としてより適切になるように通常の分子生物学的手法を用いて改変されているポリペプチドも含まれる。

10

20

30

40

50

【0106】

キメラ抗体は組換え手段により、ある1つの種の抗体産生細胞から得た軽鎖および重鎖の可変領域を、別の種由来の軽鎖および重鎖の定常領域と合わせることによって作製され得る。典型的にはキメラ抗体には、大部分がヒトドメインを有する抗体を作製するために齧歯類またはウサギ由来の可変領域とヒト定常領域が利用される。このようなキメラ抗体の作製は当技術分野において周知であり、標準的な手段 (例えば、参照により本明細書に完全に組み入れられる米国特許第5,624,659号で説明される) によって得られ得る。

【0107】

ヒト化抗体は、さらに多くのヒト様免疫グロブリンドメインを含み、かつ動物由来の抗体の相補性決定領域のみが組み込まれるように操作される。これは、モノクローナル抗体の可変領域の超可変ループの配列を注意深く検討し、ヒト抗体鎖の構造にフィットさせることによって行なわれる。見かけは複雑であるが、このプロセスは実際には簡単である。例えば、参照により本明細書に完全に組み入れられる米国特許第6,187,287号を参照のこと。

【0108】

免疫グロブリン (またはその組換え対応物) 全体に加えて、エピトープ結合部位を含む免疫グロブリン断片 (例えば、Fab'、F(ab')₂ または他の断片) を合成してもよい。

「断片」または最小限の免疫グロブリンは、組換え免疫グロブリン手法を利用してデザインされ得る。例えば、本明細書におけるいくつかの局面および態様における使用のための「Fv」免疫グロブリンは軽鎖可変領域と重鎖可変領域を合成することにより作製され得る。また、2つの相違するFv特異性を含む抗体の組合せ、例えばダイアボディも関心対象である。

【0109】

免疫グロブリンは、例えば化学的リンカー、検出可能な部分、例えば蛍光性色素、酵素、基質、化学発光部分などを付加するために翻訳後修飾されてもよく、または特異的結合部分、例えばストレプトアビジン、アビジンもしくはビオチンなどが本明細書におけるいくつかの局面および態様の方法および組成物において利用され得る。

【0110】

受容体拮抗作用を促進させるFGFR2のエピトープのマッピング

FGFR2二重パラトープアンタゴニスト抗体およびその抗原結合断片は、ポリペプチド (例えば、抗体およびその抗原結合断片) のライブラリーを、FGFR2内のエピトープに結合することができる、受容体活性化ではなく受容体拮抗作用を選択的に促進させる機能性の分子についてスクリーニングすることによって作製され得る。このようなエピトープは、抗体またはその抗原結合断片を、FGFR2内の所望のエピトープに相当する残基を含む一連の線状または環状のペプチドに対してスクリーニングすることによってモデリングされ得る。

【0111】

一例として、FGFR2から単離された個々の断片を含む、受容体拮抗作用を促進させるペプチドが、本明細書に記載または当技術分野において公知のペプチド合成手法によって合成され得る。このようなペプチドは固相表面上に固定化され、FGFR2アンタゴニスト抗体（例えば、二重パラトープ抗体およびその抗原結合断片）、例えば抗体A～Fに結合する分子について、例えばELISAベースのスクリーニングプラットフォームを使用し、確立された手順を用いてスクリーニングされ得る。このアッセイを使用すると、抗体A～Fに高い親和性で特異的に結合するペプチドは、したがって、FGFR2のエピトープ内のこれらの抗体に優先的に結合する残基を含む。この様式で同定されたペプチド（例えば、FGFR2細胞外ドメイン、例えば免疫グロブリン様ドメイン（IgI、IgII、およびIgIIIのペプチド断片）などは、本明細書におけるいくつかの局面および態様の二重パラトープ抗体の作製に有用な抗FGFR2抗体を同定するために抗体およびその抗原結合断片のライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。さらに、このようなペプチドは、FGFR2内の受容体拮抗作用を促進させるエピトープのサロゲートとしての機能を果たすため、このスクリーニング手法を用いて得られた抗体は、FGFR2内の対応するエピトープに結合する可能性が高く、受容体活性に拮抗作用性であることが期待される。

10

【0112】

FGFR2アンタゴニストポリペプチドについてのライブラリーのスクリーニング

ポリペプチド（例えば、二重パラトープ抗体または抗体断片）ライブラリーをFGFR2内のエピトープに結合することができる分子についてハイスループットスクリーニングするための方法としては、限定するわけではないが、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳動物のディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイおよびcDNAディスプレイなどのディスプレイ手法が挙げられる。生物学的に関連している分子に結合するリガンドを単離するためのファージディスプレイの使用は、例えばFelici et al. (Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995)、Katz (Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997) およびHoogenboom et al. (Immunotechnology 4:1-20, 1998) に概説されている。異なる標的、例えば細胞表面受容体またはDNAに結合するポリペプチドを選択するためのいくつかのランダム化コンビナトリアルペプチドライブラリーが構築されている (Kay (Perspect. Drug Discovery Des. 2, 251-268, 1995)、Kay et al., (Mol. Divers. 1:139-140, 1996) に概説)。複数のタンパク質および多量体型タンパク質が機能性の分子として成功裡にファージディスプレイされている (EP0349578A、EP4527839A、EP0589877A; Chiswell and McCafferty (Trends Biotechnol. 10, 80-84 1992) 参照)。また、機能性の抗体断片（例えばFab、単鎖Fv [scFv]）も発現されている (McCafferty et al. (Nature 348:552-554, 1990)、Barbas et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991)、Clackson et al. (Nature 352:624-628, 1991))。これらの参考文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

30

【0113】

本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗FGFR2ポリペプチド（例えば、二重パラトープ抗体およびその抗原結合断片）の作製に加えて、インビトロディスプレイ手法（例えば、本明細書に記載のもの、および当技術分野において公知のもの）により、本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗FGFR2ポリペプチドの親和性を改善するための方法もまた提供される。例えば、完全にランダム化された超可変領域を含む抗体およびその断片のライブラリーをスクリーニングするのではなく、超可変領域内の特定の部位の標的変異に注目した、抗体およびその抗原結合断片の縮小ライブラリーがスクリーニングされ得る。これは、例えば、超可変領域内の特定の部位にのみランダム変異がコードされた抗体またはその抗原結合断片をコードしているポリヌクレオチドのライブラリーをアセンブリングすることによって行なわれ得る。次いで、このようなポリヌクレオチドは、改善された結合親和性でFGFR2エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片についてスクリーニングするために、例えば繊維状ファージ、細菌細胞、酵母細胞、

40

50

哺乳動物の細胞内で、またはインビトロで、例えばリボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、もしくはcDNAディスプレイ手法を用いて発現され得る。例えば酵母ディスプレイは親和性成熟によく適しており、以前に、一本鎖抗体の親和性の K_D を48 fMまで改善するために使用されている（Boder et al. (Proc Natl Acad Sci USA 97:10701,2000)）。

【0114】

本明細書におけるいくつかの局面および態様のFGFR2アンタゴニストポリペプチド（例えば、一本鎖のポリペプチド、抗体およびその抗原結合断片）の作製および親和性成熟のために使用され得る追加のインビトロ手法としては、抗体またはその抗原結合断片のコンビナトリアルライブラリーをFGFR2由来のペプチドに特異的に結合することができる機能性の分子についてスクリーニングすることが挙げられる。コンビナトリアル抗体ライブラリーは、例えば、抗体またはその抗原結合断片のランダム化された超可変領域をコードしているポリヌクレオチドを、真核生物細胞または原核生物細胞内で発現させることによって得られ得る。これは、例えば、本明細書に記載または当技術分野において公知の遺伝子発現手法を用いて行なわれ得る。抗体の不均一系混合物が、例えば、プロテインAもしくはプロテインGでの選択、サイズ選別（sizing）カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、可溶性の差によって、および/またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な手法によって精製され得る。かくして得られるコンビナトリアルライブラリーのライブラリーは、例えば、このような抗体の不均一系混合物を、表面に固定化させているFGFR2由来ペプチドとともに、抗体抗原間結合が可能であるのに十分な期間、インキュベートすることによってスクリーニングされ得る。非結合抗体またはその断片は、前記表面を適切なバッファー（例えば、生理学的pH（およそ7.4）に緩衝されており、生理学的な塩濃度およびイオン強度を含み、任意でデタージェント、例えばTWEEN-20を含有している溶液）を用いて洗い流すことによって除去され得る。結合されたままの抗体は続いて、例えばELISAベースの検出プロトコルを用いて検出され得る（例えば、米国特許第4,661,445号参照;参照により本明細書に組み入れられる）。

【0115】

ポリペプチド（例えば、抗体およびその抗原結合断片）のコンビナトリアルライブラリーを、FGFR2由来のペプチドに特異的に結合するものについてスクリーニングするための追加の手法としては、抗体断片の1ビーズに1化合物型（one-bead-one-compound）ライブラリーのスクリーニングが挙げられる。抗体断片は親水性水膨潤性物質で構成された固相ビーズ上に、各ビーズに単一の抗体断片がディスプレイされるように化学合成され得る（例えば、確立されたスプリット-プール固相ペプチド合成プロトコルを用いて）。次いで、不均一系ビーズ混合物は、検出可能な部分（例えば、蛍光性色素）で任意で標識されているか、または相補的なタグ（例えば、それぞれアビジン、ビオチン、抗FLAG抗体、抗HA抗体）を用いた処理によって後で検出することができるエピトープタグ（例えば、ビオチン、アビジン、FLAGタグ、HAタグ）にコンジュゲートされているFGFR2由来のペプチドとともにインキュベートされ得る。FGFR2由来のペプチドに特異的に結合する抗体断片を含むビーズは、蛍光標識された抗原または相補的なタグとのインキュベーション後のビーズの蛍光特性を解析することによって特定することができる（例えば、共焦点蛍光顕微鏡法または蛍光活性化ビーズソーティングにより;例えば、Muller et al. (J.Biol.Chem.,16500-16505,1996)を参照のこと;参照により本明細書に組み入れられる）。かくして、FGFR2由来のペプチドに特異的に結合する抗体断片を含むビーズを、高親和性抗体断片を含まないものから分離することができる。FGFR2由来のペプチドに特異的に結合する抗体断片の配列は、当技術分野において公知の手法、中でも例えば、エドマン分解、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF MS）、核磁気共鳴（NMR）および2Dゲル電気泳動などによって決定することができる（例えば、WO2004/062553参照;参照により本明細書に組み入れられる）。

【0116】

10

20

30

40

50

抗体およびリガンドを同定する方法

抗体、抗体断片およびリガンドのライブラリーを、FGFR2に結合することができる分子についてハイスループットスクリーニングするための方法が、本明細書に記載のようなCCAを処置するために有用な二重パラトープ抗体における使用に適した抗体を同定するために使用され得る。このような方法としては、当技術分野において公知のインビトロディスプレイ手法、中でも例えばファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイおよびcDNAディスプレイが挙げられる。生物学的に関連している分子に結合するリガンドを単離するためのファージディスプレイの使用は、例えばFelici et al., *Biotechnol. Annual Rev.* 1:149-183, 1995; Katz, *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45, 1997; および Hoogenboom et al., *Immunotechnology* 4:1-20, 1998に概説されており、これらの各々の開示内容は、インビトロディスプレイ手法に関するものであるため参照により本明細書に組み入れられる。抗原結合分子を見出すことに関するものであるため各々の開示内容が参照により本明細書に組み入れられる。Kay, *Perspect. Drug Discovery Des.* 2:251-268, 1995 および Kay et al., *Mol. Divers.* 1:139-140, 1996に記載のような、細胞表面抗原に結合するポリペプチドを選択するためのランダム化コンビナトリアルペプチドライブラリーが構築されている。タンパク質、例えば多量体型タンパク質が機能性の分子として成功裡にファージディスプレイされている（例えば、EP0349578; EP4527839; および EP0589877ならびに Chiswell and McCafferty, *Trends Biotechnol.* 10:80-84 1992参照、これらの各々の開示内容は、抗原結合分子を見出すためのインビトロディスプレイ手法の使用に関するものであるため参照により本明細書に組み入れられる）。また、機能性の抗体断片、例えばFabおよびscFv断片がインビトロディスプレイ形式で発現されている（例えば、McCafferty et al., *Nature* 348:552-554, 1990; Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, 1991; および Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991参照、これらの各々の開示内容は、抗原結合分子を見出すためのインビトロディスプレイプラットフォームに関するものであるため参照により本明細書に組み入れられる）。このような手法は、中でも、FGFR2に結合する抗体を同定するため、およびその親和性を改善するために使用され得る。

【0117】

FGFR2アンタゴニスト抗体の発現のための宿主細胞

哺乳動物細胞に、本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗体をコードしているポリヌクレオチドをコトランスフェクトし得、前記抗体は組換えポリペプチドとして発現され、宿主細胞によって二重パラトープ抗体にアセンブリされる。一態様において、二重パラトープ抗体の4つの鎖をコードしているポリヌクレオチドを哺乳動物細胞にコトランスフェクトし、その発現により二重パラトープ抗体の正しいアセンブリがもたらされる（図11B）。

【0118】

抗体（例えば、二重パラトープ抗体またはその抗原結合断片）を原核生物または真核生物のどちらの宿主細胞で発現させることも可能である。特定の態様において、ポリペプチド（例えば、二重パラトープ抗体またはその抗原結合断片）の発現は、適正にフォールディングされた免疫学的に活性な抗体の最適な分泌のために真核生物細胞内、例えば哺乳動物宿主細胞内で行なわれる。本明細書におけるいくつかの局面および態様の組換え抗体またはその抗原結合断片を発現させるための例示的な哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（例えば、Kaufman and Sharp (1982, *Mol. Biol.* 159:601-621)に記載のDHFR選択可能マーカーとともに使用される Urlaub and Chasin (1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220)に記載のDHFR CHO細胞、NSO骨髓腫細胞、COS細胞、HEK293T細胞、SP2/0、NIH3T3およびBaF3細胞が挙げられる。抗体およびその断片の発現に有用であり得る追加の細胞型としては、確立されたプロトコールに従って外来DNAを含むベクターを用いて形質転換させることができる細菌細胞、例えばBL-21 (DE3) 大腸菌 (*E. coli*) 細胞が挙げられる。抗体の発現に

有用であり得る追加の真核生物細胞としては、当技術分野において公知の確立された手順に従って形質転換させ、不完全培地中で選択的に増殖させることができる酵母細胞、例えば出芽酵母 (*S.cerevisiae*) の栄養要求性菌株が挙げられる。抗体遺伝子をコードしている組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞内に導入される場合、前記抗体は、前記宿主細胞を、前記宿主細胞内での前記抗体の発現または前記宿主細胞を増殖させる培養培地中への前記抗体の分泌が可能であるのに十分な期間、培養することによって産生される。

【0119】

ポリペプチド（例えば、二重パラトープ抗体またはその抗原結合断片）は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培養培地から回収することができる。宿主細胞はまた、インタクトな抗体の一部分、例えばFab断片またはscFv分子を産生させるためにも使用され得る。また、本明細書におけるいくつかの局面および態様には、上記の手順が当技術分野において公知の確立されたプロトコールに応じてさまざまである方法も含まれる。例えば抗体の抗原結合断片を産生させるために、宿主細胞に、本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗FGFR2抗体の軽鎖または重鎖のいずれか（だが両方ではない）をコードしているDNAをトランスフェクトすることが望ましい場合があり得る。

【0120】

本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗FGFR2ポリペプチド（例えば、二重パラトープ抗体またはその抗原結合断片）は、組換え発現によって産生されたら、当技術分野において公知の任意の方法、例えば免疫グロブリン分子の精製に有用な方法によって、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、特にプロテインAもしくはプロテインGでの選択後のFGFR2に対する親和性により、およびサイズ選別カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、可溶性の差によって、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な手法によって精製され得る。さらに、本明細書に記載のいくつかの局面および態様の抗FGFR2ポリペプチドまたはその抗原結合断片を、精製を容易にするため、または治療用コンジュゲートを作製するために、本明細書に記載の、あるいはまた当技術分野において公知の異種ポリペプチド配列に融合させてもよい（以下の「FGFR2アンタゴニストポリペプチドコンジュゲート」参照）。

【0121】

単離されたら、抗FGFR2二重パラトープ抗体またはその抗原結合断片を、所望により例えば高速液体クロマトグラフィー（例えば、Fisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980) 参照; 参照により本明細書に組み入れられる）によって、または例えばSuperdex.T M.75カラム (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) でのゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに精製してもよい。

【0122】

治療方法

FGFR2ポリペプチドに結合して拮抗すると確認された二重パラトープ抗体はCCAの予防または寛解に有用である。

【0123】

治療アプローチの一例において、本明細書に記載のようにして確認された抗体は対象に投与され、このような投与は局所であっても全身性であってもよい。投与される作用物質の投薬量は、いくつかの要素、例えば個々の患者の体格および健康状態に依存する。任意の特定の対象に対して、具体的な投薬量レジメは経時的に、個々の必要性および組成物の投与または投与の管理を行なう人の専門的な判断に応じて調整されるのがよい。

【0124】

一態様において、本明細書におけるいくつかの局面および態様の抗体はFGFRの低分子阻害物質と併用して投与される。一態様において、低分子阻害物質はペミガチニブまたはNVP-BGJ398である。

【0125】

薬学的製剤

また、本明細書において、関心対象のポリペプチド（例えば、FGFR2）に結合して拮抗することができる二重パラトープ抗体を同定するための簡単な手段を提供する。治療の使用のため、本明細書に開示の方法を用いて同定された抗体は全身投与され得る、例えば、薬学的に許容されるバッファ、例えば生理学的生理食塩水で製剤化され得る。好ましい投与経路としては、例えば、患者において連続的な徐放レベルの薬物をもたらす皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内または皮内注射が挙げられる。ヒト患者または他の動物の処置は、生理学的に許容される担体中の本明細書において同定された治療薬の治療的有効量を用いて行なわれる。好適な担体およびその製剤化は、例えばE.W.MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。投与される治療用物質の量は、投与様式、患者の年齢および体重ならびに新生組織形成の臨床症状に応じて異なる。一般的に、量は、新生組織形成と関連している他の疾患の処置において使用される他の薬剤で使用されているものの範囲であるが、特定の場合では、前記化合物の高い特異性のため、必要とされる量はそれより少ない。本明細書におけるいくつかの局面および態様の作用物質は、受容体に対するリガンド結合を阻止する投薬量および/または受容体活性を阻害する投薬量で投与される。

10

【0126】

薬学的組成物の製剤化

二重パラトープ抗体の投与は、他の成分と合わせて新生組織形成の寛解、低減または安定化に有効である治療薬濃度がもたらされる任意の適切な手段によるものであり得る。前記化合物は、任意の適切な担体物質中に任意の適切な量で含められ得、一般的に、組成物の総重量の1~95重量%の量で存在させる。前記組成物は、非経口（例えば、皮下、静脈内、筋肉内または腹腔内）投与経路に適切である投薬形態で提供され得る。薬学的組成物は、慣用的な製薬実務に従って製剤化され得る（例えば、Remington:The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.) ,ed.A.R.Gennaro,Lippincott Williams & Wilkins,2000およびEncyclopedia of Pharmaceutical Technology,eds.J.Swarbrick and J.C.Boylan,1988-1999,Marcel Dekker,New York参照）。

20

【0127】

本明細書におけるいくつかの局面および態様による薬学的組成物は、活性化合物が投与されたら実質的に即座に、または投与後、任意の所定の時点もしくは任意の所定の期間後に放出されるように製剤化され得る。後者の型の組成物は、一般的に制御放出製剤として公知であり、(i) 体内に長期間にわたって実質的に一定の薬物濃度をもたらす製剤; (ii) 所定の時間差の後に体内に長期間にわたって実質的に一定の薬物濃度をもたらす製剤; (iii) 体内で比較的一定の有効なレベルを維持するとともに、活性物質の血漿レベルの変動（ギザギザの速度論パターン）と関連している望ましくない副作用を最小限にすることによって所定の期間中、作用を持続させる製剤; (iv) 例えば制御放出組成物を胸腺の近傍にまたは胸腺と接触状態で空間的に配置することによって作用を局在化させる製剤; (v) 用量が例えば1週間または2週間毎に1回投与されるような簡便な投薬を可能にする製剤; および (vi) 治療用物質を特定の細胞型（例えば、腫瘍細胞）に送達するための担体または化学的誘導體を使用することによって新生組織形成を標的にする製剤が挙げられる。いくつかの適用では、制御放出製剤により、血漿レベルを治療レベルに維持するために1日の間に頻繁に投薬を行なう必要がなくなる。

30

40

【0128】

当該化合物の放出速度が代謝速度を上回る制御放出を得るために任意のいくつかの戦略が遂行され得る。一例において、制御放出は、種々の製剤化パラメータおよび成分、例えば、種々の型の制御放出組成物およびコーティングなどの適切な選択によって得られる。したがって、治療薬は適切な賦形剤とともに薬学的組成物に製剤化され、これは、投与されると前記治療薬を制御様式で放出する。例としては、単回または反復用の単位錠剤またはカプセル組成物、油状の液剤、懸濁剤、乳剤、マイクロカプセル、マイクロスフェア、分子複合体、ナノ粒子、貼付剤およびリポソームが挙げられる。

50

【0129】

非経口組成物

前記薬学的組成物は投薬形態、製剤での、または慣用的な無毒性の薬学的に許容される担体および佐剤が収容された適切な送達デバイスもしくは埋入物による注射、輸注または留置（皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内など）によって非経口投与され得る。このような組成物の製剤化および調製は医薬の製剤化の技術分野の当業者に周知である。製剤化は、前出のRemington:The Science and Practice of Pharmacyをみるとよい。

【0130】

非経口使用のための組成物は、単位投薬形態で（例えば、単回用量アンプルで）、または数回分の用量が収容され、適切な防腐剤が添加されてもよいバイアルで提供され得る（下記参照）。前記組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、輸注デバイスもしくは留置用の送達デバイスの形態であり得るか、または使用前に水もしくは別の適切なビヒクルを用いて再構成される乾燥粉末剤として提示され得る。新生組織形成を低減または寛解させる活性作用物質の他に、前記組成物には非経口に許容される適切な担体および/または賦形剤が含まれ得る。活性な治療用物質が、制御放出のためのマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノ粒子、リポソームなどに組み込まれ得る。さらに、前記組成物には懸濁化剤、可溶化剤、安定化剤、pH調整剤、張性調整剤および/または分散化剤が含まれ得る。

【0131】

上記のように、本明細書におけるいくつかの局面および態様による薬学的組成物は滅菌注射に適した形態であり得る。このような組成物を調製するため、適切な活性な治療薬を非経口に許容される液状ビヒクル中に溶解または懸濁させる。中でも、使用され得る許容されるビヒクルおよび溶媒は水、適切な量の塩酸、水酸化ナトリウムもしくは適切なバッファの添加によって適切なpHに調整された水、1,3-ブタンジオール、リンゲル液および等張性塩化ナトリウム溶液ならびにデキストロース液である。また、水性製剤には、1種類または複数種類の防腐剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、エチルまたはn-プロピル）が含まれ得る。化合物のうちの1つが水に微溶性または難溶性にすぎない場合、溶解向上剤または可溶化剤を添加してもよく、溶媒に10～60%w/wのプロピレングリコールなどを含めてもよい。

【0132】

FGFR2細胞外エピトープを認識する二重パラトープ抗体

本明細書に記載のような局面および態様は、少なくとも一部において、FGFR2に拮抗することができる二重パラトープ抗体が、がん、例えばCCAを直接処置するための治療用物質として使用され得ることを見出したことに基づく。このような治療活性は、例えば、前記抗体が細胞、例えばがん細胞の表面上に発現された2つのエピトープに結合し、続いて、FGFRリガンドの結合を阻止および/またはFGFR2活性を阻害し、それにより増殖を阻害または細胞死を誘導することによって引き起こされ得る。いくつかの態様において、二重パラトープ抗体は、がん細胞における抗体由来細胞傷害（ADCC）を向上させるために使用される。

【0133】

本明細書における局面および態様の実施では、特に記載のない限り、十分に当業者の技能の範囲内である分子生物学（組換え手法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の慣用的な手法を使用する。このような手法は、文献、例えば“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,second edition (Sambrook,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(Gait,1984);“Animal Cell Culture”(Freshney,1987);“Methods in Enzymology”“Handbook of Experimental Immunology”(Weir,1996);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(Miller and Calos,1987);“Current Protocols in Molecular Biology”(Ausubel,1987);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis,1994);“Current Protocols in Immunology”(Coligan,1991)に十分に説明されている。このような手法は、本明細書におけるいくつかの局面および態様のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作製

10

20

30

40

50

に適用可能であり、そのため、本明細書における局面および態様のいくつかの作製および実施において考慮され得る。特定の態様に特に有用な手法を以下のセクションに論考する。

【0134】

以下の実施例は、当業者に本明細書におけるいくつかの局面および態様のアッセイ、スクリーニング、および治療方法をどのようにして構成および使用するかの完全な開示および説明を提供するために示しており、本明細書における種々の局面および態様の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0135】

実施例1:胆管がん(CCA)内のFGFR2のターゲティング

FGFR2の別のタンパク質との融合をもたらすゲノム変化はCCAにおいて一般的である。肝内CCAを駆動するFGFR2融合体の解析を容易にするため、以下のFGFR2融合体を作製した:FGFR2-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(PHGDH)、FGFR2-アデノシルホモシステイナーゼ様1(AHCYL1)およびFGFR2-BICC1(図1A)。細胞増殖に対するFGFR2融合体の効果を解析した(図1B)。IL3枯渇アッセイにおいて、BaF3細胞はFGFR2-AHCYL1融合体、FGFR2-PHGDH融合体の形質転換がなされた(図1B)。また、BaF3細胞は一部においてFGFR2-BICC1の形質転換がなされた。

【0136】

実施例2:FGFR2融合体の発現は形質転換に充分であった

NIH3T3細胞に対するFGFR2融合体の発現の効果もまた試験した。興味深いことに、フォーカスフォーメーションアッセイで示されるように、FGFR2融合体は前記細胞の形質転換に充分であった。FGFR2-AHCYL1、FGFR2-PHGDHおよびFGFR2-BICC1を発現しているNIH3T3細胞はすべて、培養状態でコロニーを形成し、これは発がん性形質転換を示す(図3A)。図3Bは、FGFR2融合体を発現しているNIH3T3細胞の培養物中に存在しているコロニーの数の定量である。このデータは、FGFR2融合体の発現がNIH3T3細胞の形質転換に充分であったことを示す。

【0137】

NIH3T3細胞におけるFGFR2-BICC1、FGFR2-AHCYL1、およびFGFR2-PHGDHの発現により増殖の増大が誘導された。FGFR2融合体を発現している細胞は対照細胞より増殖が速く、この応答はFGFR2リガンドの存在下で増強された(図4A)。細胞の形質転換および増殖に対するFGFR2-BICC1融合体のIg様細胞外ドメインの欠失の効果を図4B~4Dに示す。図4Eおよび4Fにおいて、CCA患者1~4はFGFR2のECD内に変異を有していた。特に、CCA患者1、3、および4ではFGFR2変異はECDのドメインIgIII内に存在し、患者2ではFGFR2変異はECDのドメインIgII内に存在した。FGFR2のECD内のこのような変異は細胞の形質転換を増大させ得る。図4Eに示されるように、CCA患者由来のFGFR2細胞外ドメインの変異は形質転換能を高めた。図4Fに示されるように、いくつかの親抗体は、患者由来のFGFR2のECD変異駆動性の細胞増殖の阻害または阻止に有効であることが示された。一例として、非特異的Ab(IgG)対照(図4F)からの増大倍率または低減倍率の評価によって測定されるように、抗体C、D、およびEは、患者由来のFGFR2のECDの活性化変異を有する細胞の増殖を阻止するのに有効であった;したがって、二重パラトープ抗体におけるこれらの抗体の結合領域の組合せにより、おそらく相乗的な阻止効果がもたらされ得る。

【0138】

実施例3:FGFR2融合体の阻害

BGJ398(NVP-BGJ398とも称する)は、フェーズIIの治療においてFGFR2融合体陽性ICCを有する患者で有望な有効性が示されたFGFR2の低分子阻害物質である。FGFR2融合体を発現しているBaF3細胞に対するNVP-BGJ398の阻害活性を試験した。興味深いことに、細胞は、生存アッセイにおいてFGFR2阻害物質に対する感受性を示した(図2)。また、FGFR2-BICC1、FGFR2-AHCYL1およびFGFR2-PHGDH融合体を有する

10

20

30

40

50

ように形質転換されたNIH3T3細胞もBGJ398処理に対して感受性であった（図5）。このような結果は、これらの融合体がFGFRを介してシグナル伝達することを示す。

【0139】

FGFリガンドのFGF10はFGFR2-PHGDH融合体発現BaF3細胞の増殖を増強した（図6A）。この効果をIL3枯渇アッセイにおいて定量した（図6B）。この細胞がIL3の非存在下で増殖する能力は「形質転換能」を示す。図6Bにおいて、+IL3の親細胞は対照であり、FGFR2-PHGDHの増殖を対照からの差の倍率として測定する。非存在下である-IL3ではBaF3親細胞は死滅するが、FGFR2-PHGDH発現細胞は-IL3条件で増殖し続け、BaF3細胞はFGFR2-PHGDHの形質転換がなされたことを示す。

【0140】

実施例4:二重パラトープ抗体のデザイン

本明細書において上記に詳述したように、BGJ398はFGFR2を阻害することができる。この阻害は、さまざまな細胞型においてFGFR2融合体発現の発がん性効果を低減させるのに有効であった。FGFR2受容体に結合して拮抗する二重パラトープ抗体は、がん（例えば、CCA）の処置に有用であることが期待される。このような抗体は、抗発がん活性について生存アッセイ、結合アッセイ、および二量体化アッセイにて、FGFR2融合体発現するよう形質転換されたBaF3およびNIH3T3細胞において試験され得る。

【0141】

二重パラトープ抗体のデザインにおいて、本出願人は、FGFR2融合体を発現するよう形質転換された細胞の増殖に寄与するFGFR2細胞外ドメインに特異的に結合する抗体に着目した。抗体A～Fは特許文献に記載されており（図7B）、FGFR2の細胞外ドメイン内に存在するエピトープ（図7A）に結合する市販の抗体である。

【0142】

FGFR2細胞外ドメインの前記抗体によって結合された領域は、シグナルペプチド（SP）ならびに3つの免疫グロブリン様ドメイン（IgI、IgII、およびIgIII）を含む。抗体A～Fを、FGFR2の増幅を有するSNU-16胃がん細胞株のFACS解析において使用した（図7A、7B）図の右側に、GFP陽性であった細胞の割合を、図に示した種々のFGFR2ドメインに対する抗体A～Fの抗体濃度の対数の関数として示す。このような結果は、抗体A～FすべてがFGFR2発現細胞に特異的に結合したことを示す。

【0143】

抗体A～Fを、これらがFGFR2IIb発現BaF3細胞のリガンド誘導性増殖を阻害し得るかどうかを調べるために試験した。FGFR2 Ig-2およびIg-3に結合する抗体C、DおよびEは、野生型FGFR2IIbを発現しているBaF3細胞のリガンド誘導性増殖を阻止するのに有効であった（図8）。次いで、抗体A～Fの効果を、FGFR2-PHGDH融合体を発現しているBaF3細胞において試験した。興味深いことに、抗体AおよびCならびに程度は低いDはすべて、FGFリガンドの非存在下でアゴニスト活性を示した（図9）。抗体Fは、BaF3細胞においてFGFR2-PHGDH活性化性融合体を阻害した（図9）。

【0144】

FGFR2-PHGDH融合体を発現しているBaF3細胞の増殖を、FGFリガンドのFGF10の存在下でアッセイした。抗体C、D、E、およびFは、FGFR2-PHGDH融合体発現BaF3細胞のリガンド刺激性増殖を阻害した（図10）。本明細書において上記に報告した結果に基づき、図11Aに示すFGFR2抗体の組合せを用いて二重パラトープアンタゴニスト抗体を作製する。これらの組合せにより、FGF2融合体を過剰発現した発がん性細胞またはがん細胞（例えば、形質転換されたBaF3細胞）において増殖阻害効果の増大がもたらされる。したがって、エピトープに結合する抗体は、がん細胞に対して増大した阻害性効果および殺作用効果を有する。二重パラトープアンタゴニスト抗体のデザインを図11Bおよび11Cに示す。好都合には、半分の二重パラトープ抗体上のVH-VLおよびCH1-CLにおける相補的な変異を含めることにより、同じ抗体の他方の半分からの鎖ではなく2つの異なる鎖の間で優先的ヘテロ二量体ペアリングがもたらされる。あるいはまた、scFab、scFv、またはDuoBodyを作出するためにリンカー法が使用される。この方法では、2つ

10

20

30

40

50

の抗体鎖を各々、異なる細胞内で生成させ、インビトロで混合する。このような方法は当技術分野において公知であり、例えばK.Ding et al, March 2017, Appl. Microbiol. Biotechnol., 101 (5) :1889-1898; および V.Jaeger et al., 2013, BMC Biotechnol., 13:52に記載されている。

【0145】

FGFR2抗体の検証を、FACS解析を用いてアッセイした(図12)。結合アッセイにおいて、抗体がFGFR2に結合すると生じる蛍光レベルのシフトを陰性およびIgG対照において観察した(図12)。シフトは、FGFR2への結合の増大に伴って増大した(図12)。種々の曲線は、使用された抗体の濃度を示す。GA抗体(「抗体E」とも称する)はGalaxyから入手した。以前の試験では、これは約1nMの30.68 Kdを有し、図7Bに示されるように、実験により1.58 nMであることがわかった(nM)(FACS)。右側パネルに、種々のGA抗体濃度における蛍光を示した細胞のパーセンテージを示した。右のグラフに、陽性蛍光を伴う細胞のパーセントの数値を、Galaxy抗体濃度の対数の関数として示す。解析したFGFR2抗体はすべて、FGFR2に特異的に結合した(図13)。

10

【0146】

したがって、抗体A~Fのいずれかを使用して、FGFR2の細胞外ドメイン内に存在するエピトープに結合する二重パラトープ抗体を作製する(図11A~11C)。このような抗体をコードしているポリヌクレオチドが所望の培養細胞型において組換え発現され得、抗体が培養液から精製され得る。一態様において、二重パラトープ抗体をコードしている4つの鎖をHEK細胞の培養物にコトランスフェクトし、これにより、二重パラトープ抗体の正しいアセンブリがもたらされる。一態様において、抗体の精製は、例えばHisTrap Excel Nickelカラムを用いたニッケル精製によって行なわれ得る。図11Dに示されるように、ホモ二量体型K409R抗体およびヘテロ二量体型F405L/K409R duobodyに対して、ニッケル精製を使用すると、タグ付けされていないホモ二量体型K409R(親抗体、タグ付けされていない)抗体はいずれも、20カラム容量で0から400 nMまでのイミダゾール勾配の使用でニッケルカラムに結合しなかった。図11Dに示されるように、1つのHisタグ重鎖を含むヘテロ二量体型F405L/K409R duobodyが最初にニッケルカラムから溶出され(上の溶出プロファイル図、「His/His親Ab」)、一方、2つのHisタグを含むホモ二量体型F405L抗体は後の方の溶出時点を示した(下の溶出プロファイル図。「His/Hisなし二重パラトープAb」)。ヘテロ二量体型duobody抗体を含む画分をプールし、PBSにバッファー交換し、1 mg/mlの濃度に濃縮した。

20

30

【0147】

実施例5:FGFR2の二量体化を測定するためのNANOBIT(登録商標)アッセイの開発

細胞におけるFGFR2の二量体化を測定するため、および特に、FGFR2の二量体化を破壊することができる二重パラトープ抗体についてスクリーニングするためのNANOBIT(登録商標)アッセイを開発した。CCAを有する患者にみられるFGFR2融合体は細胞におけるFGFR2の二量体化を助長し、これによってさらに構成的FGFR2シグナル伝達が活性化され、前記細胞の発がん性形質転換および細胞増殖の増大ならびにがん細胞の増殖がもたらされる。NANOBIT(登録商標)は、タンパク質:タンパク質相互作用の細胞内検出のために使用され得るNanoLucルシフェラーゼに基づく2サブユニット系であり(例えば、Promega Corporation, Madison, WI, 2017, “Using NANOBIT(登録商標) Technology to Study the Dynamics of Protein Interactions in Live Cells”を参照のこと)関心対象のタンパク質に融合されたLarge BiT(LgBiT;17.6 kDa)サブユニットとSmall BiT(SmBiT;11個のアミノ酸)サブユニットで構成されている(図16B)。タンパク質間相互作用によってサブユニットが近接して機能性の酵素を形成し、これが明るい発光シグナルを生成する。lgサブユニットおよびsmサブユニットは、自発的会合のための低い親和性に基づいて選択される。FGFR2受容体の場合、FGF10リガンドまたはFGFR2融合体がFGFR2受容体と一体となり、NANOBIT(登録商標)アッセイにおいて発光シグナルの増大をもたらす。

40

【0148】

50

タンパク質:タンパク質ペアのN末端とC末端に融合されたLgBiTおよびSmBiTをコードしている異なる発現構築物（例えば、8種類まで）を作製した。細胞に一過的または安定的にトランスフェクトするためにこの構築物を用いた。FGFR2-WT（野生型）、FGFR2-ACHYL1およびFGFR2-BICC1のNANOBIT（登録商標）構築物を、HEK293T細胞における一過性発現に使用した（図16C）。FGFR2-WT（野生型）、FGFR2-ACHYL1およびFGFR2-BICC1のNANOBIT（登録商標）構築物を、HEK293T細胞における安定発現に使用した。（図16Dおよび16E）。図16Fは、FGFR2を発現している安定細胞株を抗体A～F（図7Bにおいて確認されるとおり）に供し、NANOBIT（登録商標）アッセイを行なった結果を示す。図16Fの左のグラフに示されるように、いくつかの抗体は、FGFR2（FGFR2IIIb）を安定的に過剰発現しているHEK293T細胞の増殖を阻害した。特に、細胞増殖阻害に対してその他の抗体と比べて最も著明な効果を示す抗体DをNANOBIT（登録商標）アッセイにおいて使用した（図16Fの右のグラフ）。このグラフに示されるように、このアッセイにおいて、FGFR2を安定的に発現している細胞に抗体Dを漸増濃度で添加すると、FGFR2受容体のFGF誘導性二量体化が阻止される。図16Fの最も右側のグラフに、アッセイにおいてFGFR2 WT（野生型）で生じた発光の倍率を図16Fに示す3つのバーの各セットの左のバーで示し;アッセイにおいてFGFR2+FGF10リガンドで生じた発光の倍率を3つのバーの各セットの真ん中のバーで示し;アッセイにおいて+/-FGF10リガンドの差で生じた発光の倍率を3つのバーの各セットの右のバーで示す。
【0149】

10

実施例6:二重パラトープ抗体の結合親和性

20

当技術分野において公知のような表面プラズモン共鳴（SPR）を用いて二重パラトープ抗体の結合親和性を調べた。SPRベースの結合方法は、センサーチップの表面上へのリガンド（抗体）の固定化を含む。関心対象の結合パートナーまたは被検物質（FGFR2のECD）がフローチャネルを通り抜けて流れる。異なる濃度の被検物質がリガンド上を流れ、リガンド-被検物質の相互作用が特性評価され得る。センサーチップの表面の光源の屈折率の変化によってSPRシグナルが生じる。結合事象に伴う質量の増加によって屈折率の比例的増大が引き起こされ、これは応答-共鳴シグナルの変化として観察される。簡単には、本明細書に記載の抗体を用いた実験では、1～1000nMの範囲の濃度の抗体（被検物質として使用）の固定化およびFGFR2bαIIIb抗原（リガンドとして使用）のフロースルーによってSPRアッセイを行なった。FGFR2bαIIIb抗原との相互作用の抗体速度論データを、Biocoreソフトウェアを用いて2ステートの（2-state）1-1結合モデルにフィットさせた。K_D値の平均および標準偏差は少なくとも3つの独立した実施によって得たものである。

30

【0150】

SPRを使用し、二重パラトープ抗体のアビディティをその親抗体と比較するために単一の抗原FGFR2bαIIIbに対する結合に関する6種類の単一特異性抗体および13種類の二重パラトープ抗体の速度論を測定した。理論に拘束されることを望まないが二重パラトープ抗体はその親抗体より強固にFGFR2抗原に結合すると考えられるということ、ならびに評価した抗体の中でより強固に結合する二重パラトープ抗体はFGFR2の二量体化の阻止においてより効率的であり（図17A）、それにより、構成的FGFR2シグナル伝達および/または発がん性形質転換の阻害または阻止がもたらされることが考えられるということが予想された。結合速度論の評価の結果を図17Bおよび17Cに示す。

40

【0151】

図17Bの表は、単一のFGFR2抗原FGFR2bαIIIbに結合するための6種類の単一特異性抗体および13種類の二重パラトープ抗体の速度論の測定値を示す。FGFR2bαIIIbに結合するすべての抗体のK_D値の比較を、K_D値に基づいた抗体のランキングとともに図17Bに示す（最も親和性が低い結合体から最も親和性が高い結合体まで）。一般的に、二重パラトープ抗体は、FGFR__GA/N__12433およびFGFR__B/GA二重特異性抗体以外、FGFR2bαIIIb抗原に単一特異性抗体より強固に結合した（図17B）。FGFR__GA/N__12433およびFGFR__B/GAはどちらも、二重パラトープ抗体について予想されるもの

50

より顕著に大きい化学量論結合（すなわち、1に近い化学量論結合）を示した。理論に拘束されることを意図しないが、具体的な二重パラトープ抗体の結合結果は、これらが、従来の操作された二重パラトープの機構によって結合しているのではなく、単一特異性抗体のものと同様の結合特徴または混合型の結合機構を示している可能性があることを示唆する。

【0152】

親（単一特異性）抗体は標的抗原としてのFGFR2b α IIIbに対して、二重パラトープ抗体によって示された結合親和性と比べて低い結合親和性を示した。FGFR2に対して低い結合親和性を有する6種類の単一特異性抗体には、図7Bの命名に基づいて、抗体FGFR__B (KD (M) 1.6E-08); FGFR__N__12433 (KD (M) 7.5E-09); (FGFR__GA (KD (M) 7.5E-09); FGFR__Gal23 (KD (M) 2.1E-09); FGFR__N__10164 (KD (M) 1.7E-09); およびFGFR__GE__FL (KD (M) 9.9E-10) を含める。図17Bの表の残りの13種類の抗体は、SPRによる測定時、FGFR2 α IIIbに対して高い結合親和性を有する二重パラトープ抗体を示す。図17Cのマトリックス表は、二重パラトープ抗体の各アームについて得られたKDの比較を示す。

10

【0153】

実施例7: FGFR2融合体駆動性細胞増殖に対する二重パラトープ抗体の影響

FGFR2融合体駆動性細胞増殖に対する二重パラトープ抗体の影響を細胞ベースのアッセイにおいて、FGFR2のECDに結合する、上記（実施例4）に記載のようにして作製した二重パラトープ抗体を用いて評価した。本明細書に記載のように、二重パラトープ抗体を、FGFR2融合体を過剰発現するように分子操作された細胞（例えば、NIH3T3細胞またはBaF3細胞）の培養物に添加した。

20

【0154】

特に、BaF3細胞を使用するアッセイ（図18A～18D）では、空のベクター対照またはFGFR2-PHGDH融合体構築物を過剰発現しているBaF3細胞を、IL3およびFGFの非存在下で384ウェル黒色プレート内に750細胞/ウェルの濃度で一晩プレーティングした。6種類の親抗体および13種類の二重パラトープ抗体を各ウェル内に二連で、1 μ Mから0.013 μ Mまで（1 μ M、0.833 μ M、0.600 μ M、0.450 μ M、0.316 μ M、0.233 μ M、0.166 μ M、0.125 μ M、0.091 μ M、0.066 μ M、0.048 μ M、0.035 μ M、0.025 μ M、0.018 μ Mおよび0.013 μ M）の範囲の種々の濃度で添加した。細胞の生存を、処理後5日目にCellTiter-Gloを用いて測定し、IC50曲線を、PRISM 9ソフトウェアの非線形フィットを用いて作成した。FGFR2のECDに結合する二重パラトープ抗体、すなわち、図7Bの特性評価された抗体の結合領域を含む二重パラトープ抗体GA/N12（図18A）、二重パラトープ抗体GA/Gal23（図18B）、二重パラトープ抗体Gal23/N12（図18C）および二重パラトープ抗体B/N12（図18D）をBaF3細胞ベースのアッセイにおいて使用し、その活性およびFGFR2-PHGDHを過剰発現しているBaF3細胞の増殖の阻害に対する各二重パラトープ抗体の効果を評価した。図18A～18Dに示されるように、二重パラトープ抗体GA/N12、GA/Gal23、Gal23/N12およびB/N12は、FGFR2-PHGDH融合体（胆管がん患者にみられる）を過剰発現するように分子操作されたBaF3細胞の増殖の阻害において、空のベクターを過剰発現している対照細胞と比べてより有効かつ強力であった。また、これらの二重パラトープ抗体は、FGFR2-PHGDH融合体を過剰発現しているBaF3細胞の増殖の阻害において、その親抗体と比較してもより効率的であった。

30

40

【0155】

NIH3T3細胞を使用するアッセイ（図19A～19E）では、FGFR2-BICC1融合体構築物を過剰発現しているNIH3T3細胞を384ウェル黒色プレート内に1000細胞/ウェルの濃度で一晩プレーティングした。6種類の親抗体および13種類の二重パラトープ抗体を各ウェル内に二連で、1 μ Mから0.013 μ Mまで（1 μ M、0.833 μ M、0.600 μ M、0.450 μ M、0.316 μ M、0.233 μ M、0.166 μ M、0.125 μ M、0.091 μ M、0.066 μ M、0.048 μ M、0.035 μ M、0.025 μ M、0.018 μ M、および0.013 μ M）の範囲の

50

種々の濃度で添加した。細胞のコンフルエンスを、処理後60時間目にIncucyteを用いて測定し、IC50曲線を、PRISM 9ソフトウェアの非線形フィットを用いて作成した。図19A～19Eに示されるように、二重パラトープ抗体:GE/N10、GE/N12、B/GE、B/GAおよびB/N12は、FGFR2-BICC1融合体（胆管がん患者にみられる）を過剰発現しているNIH3T3細胞の増殖の阻害において、その親抗体と比べてより有効かつ強力であった。

【0156】

上記の6種類の親抗体には、例えば図7Bに示すような抗体A（B）、抗体B（Gal23）、抗体C（N10）、抗体D（GE）、抗体E（GA）、抗体F（N12）を含めた。二重パラトープ抗体は6種類の親抗体のペアワイズな組合せである。13種類の二重パラトープ抗体はduobody反応によって成功裡に作製された（例えば、二重パラトープ抗体およびそのFGFR2結合のKDを示す図17Bを参照されたい）。

10

【0157】

他の態様

前述の説明から、本明細書におけるいくつかの局面および態様に対して、それらを種々の使用および条件に適合させるために変形および修正が行なわれ得ることは明らかであろう。このような態様もまた、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0158】

本明細書における可変部の任意の定義における列挙した要素の記載は、任意の単独の要素としての前記可変部の定義または列挙した要素の組合せ（もしくは部分的組合せ）としての前記可変部の定義を含む。本明細書における一態様の記載は、任意の単独の態様としての前記態様または任意の他の態様もしくはその一部分との組合せでの前記態様を含む。

20

【0159】

本明細書において言及した特許および刊行物はすべて、参照により、あたかも個々の各特許および刊行物が参照により組み入れられて具体的に個々に示されているのと同程度に本明細書に組み入れられる。

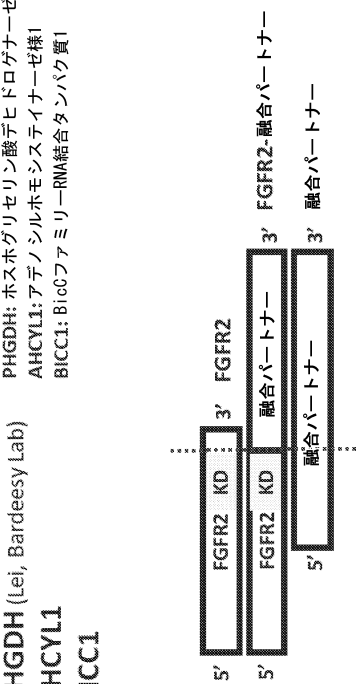
30

40

50

【図面】

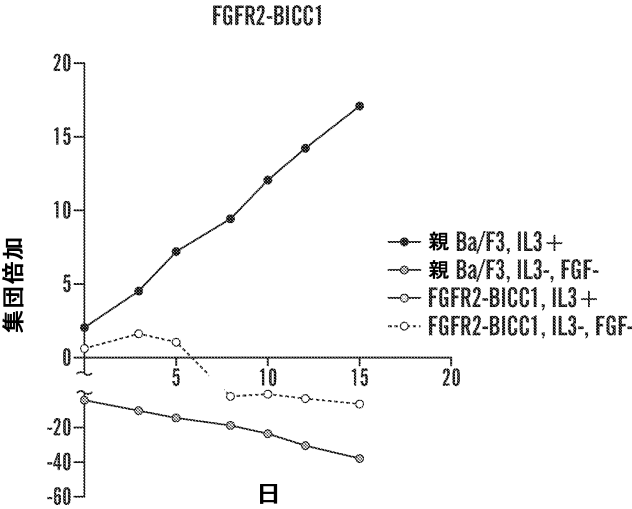
【図 1 A】



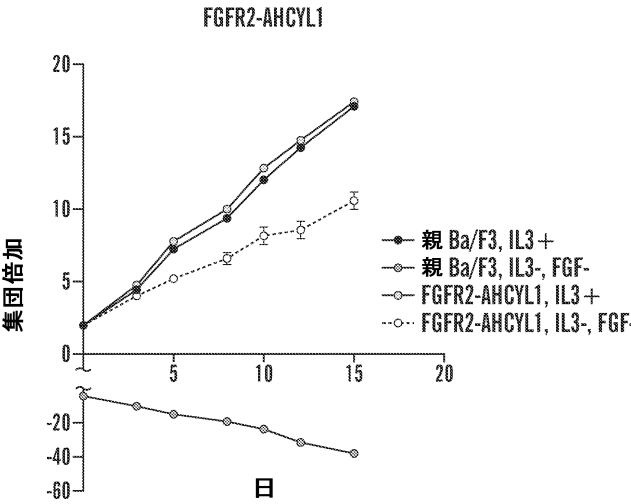
- FGFR2-PHGDH (Lei, Bardeesy Lab)
- FGFR2-AHCYL1
- FGFR2-BICC1

FGFR2融合体駆動性ICCモデルの作製

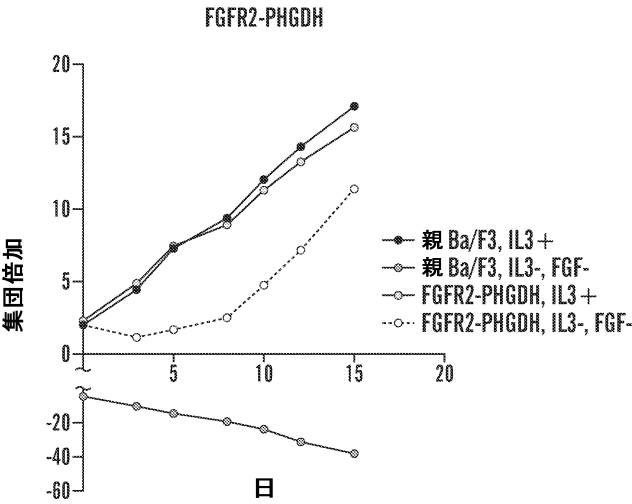
【図 1 B - 1】



【図 1 B - 2】



【図 1 B - 3】



10

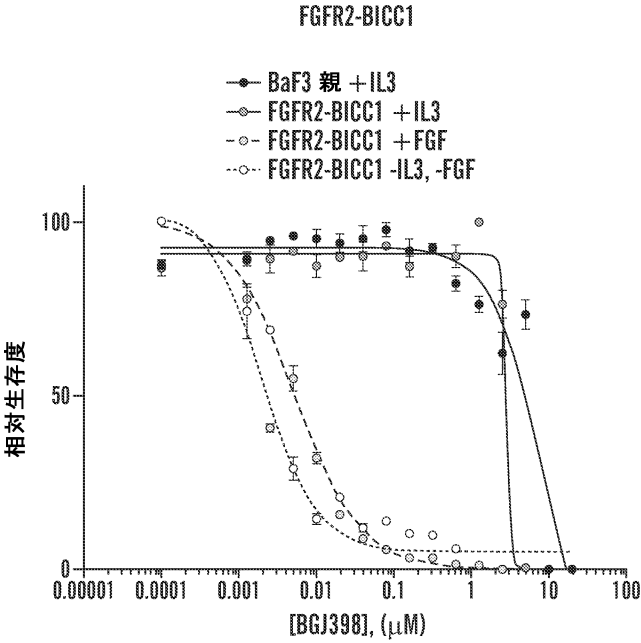
20

30

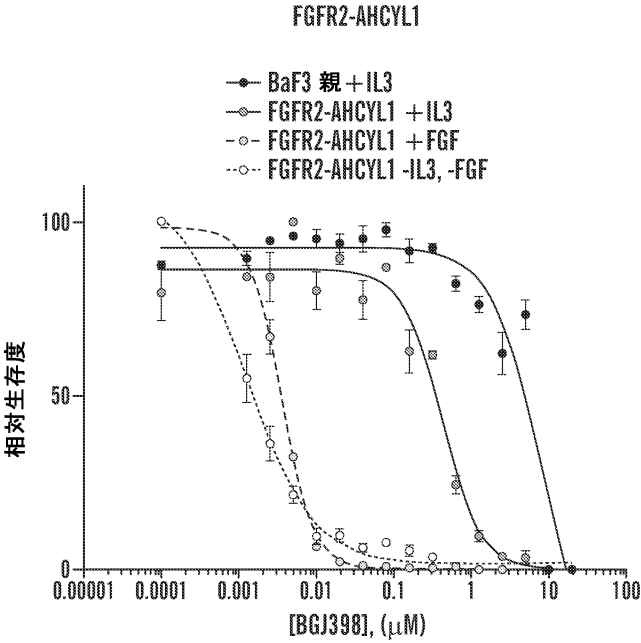
40

50

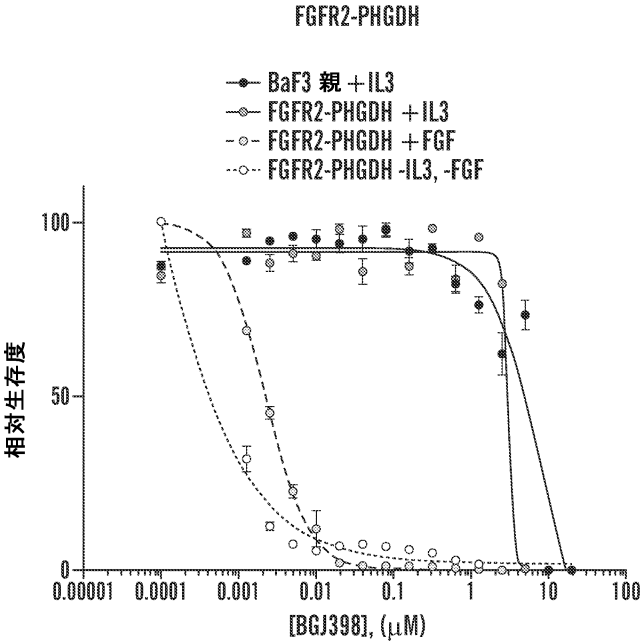
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



【図 2 - 3】



【図 2 - 4】

FGFR2-PHGDH -IL3, -FGF	4.55E-05
FGFR2-PHGDH + FGF	0.002217
FGFR2-PHGDH + IL3	3.082
FGFR2-AHCYL1 -IL3, -FGF	0.001223
FGFR2-AHCYL1 + FGF	0.003578
FGFR2-AHCYL1 + IL3	0.4211
FGFR2-BICC1 -IL3, -FGF	0.00207
FGFR2-BICC1 + FGF	0.005355
FGFR2-BICC1 + IL3	2.832
BaF3 親 + IL3	8.191
BGJ398 IC ₅₀ μM	

10

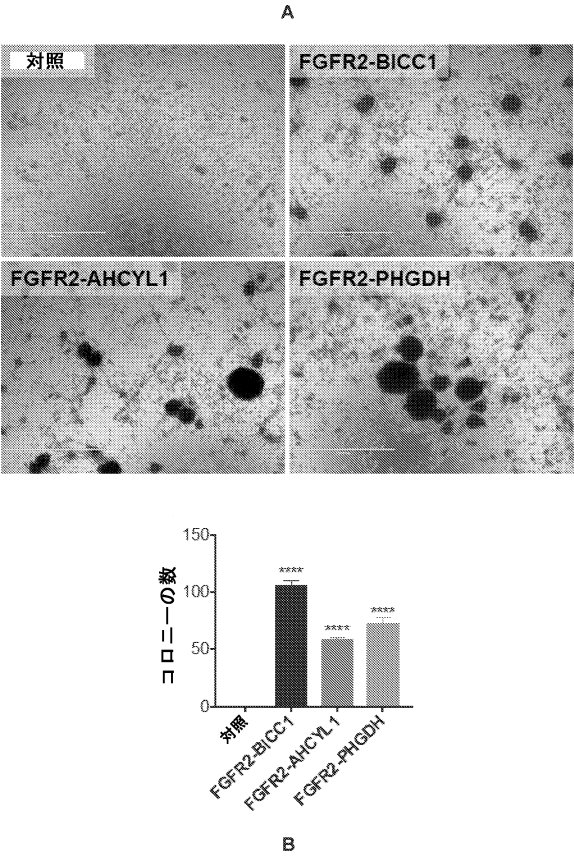
20

30

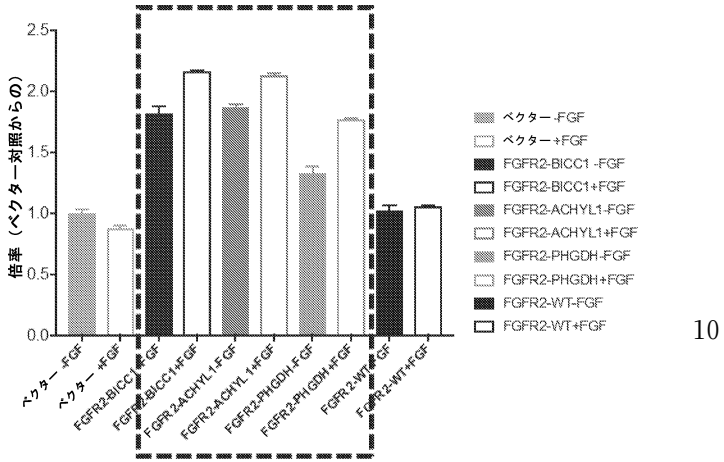
40

50

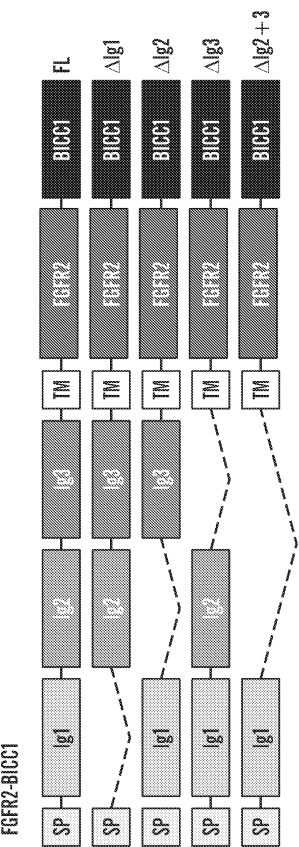
【図 3】



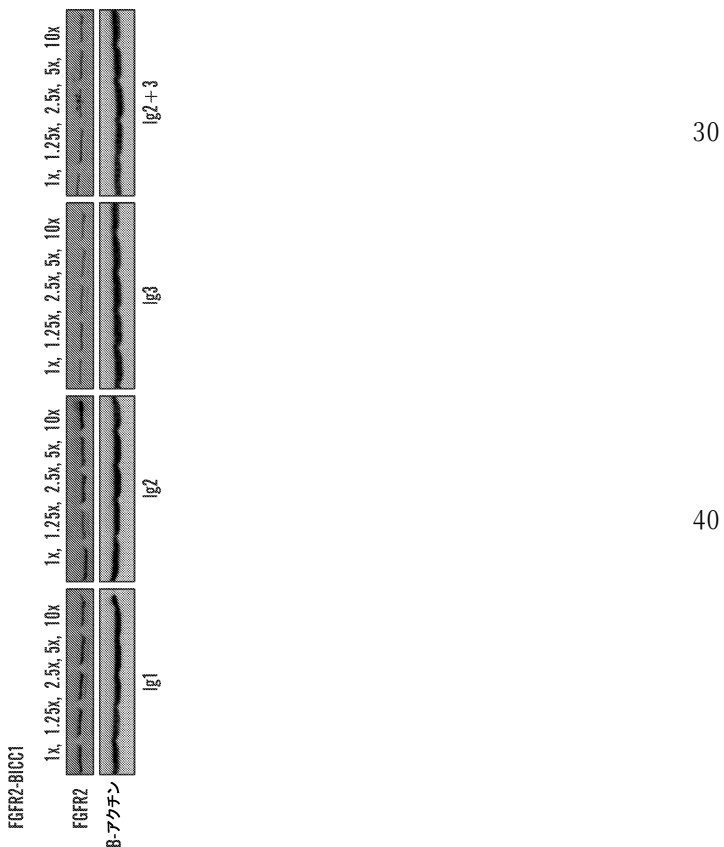
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

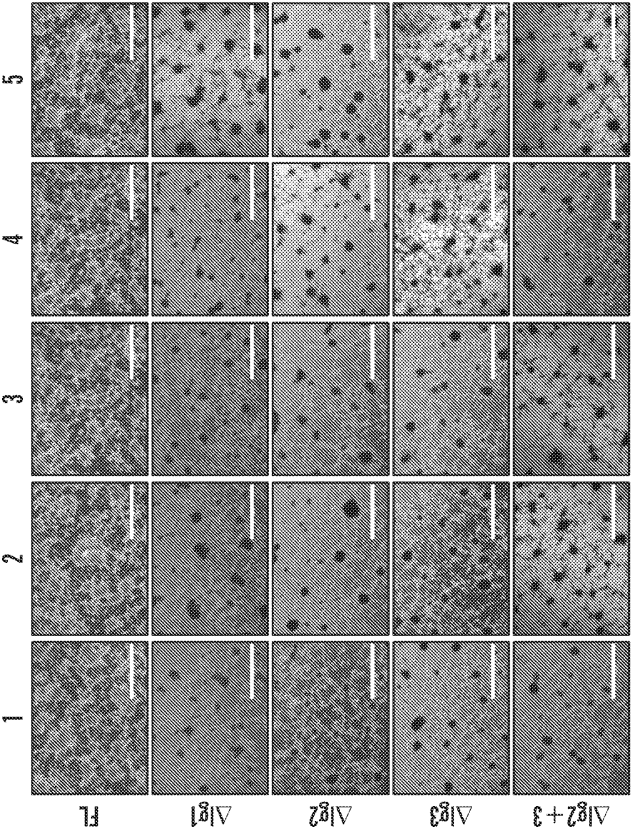
20

30

40

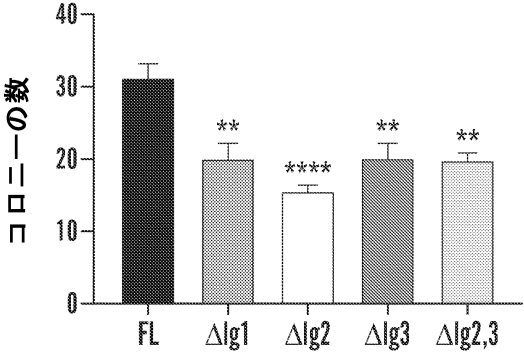
50

【図 4 D - 1】

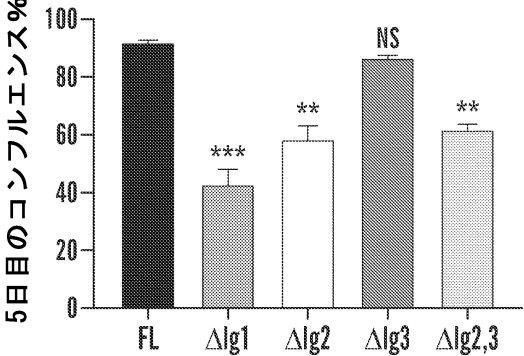


【図 4 D - 2】

FGFR2-BICC1バリエントの
形質転換能

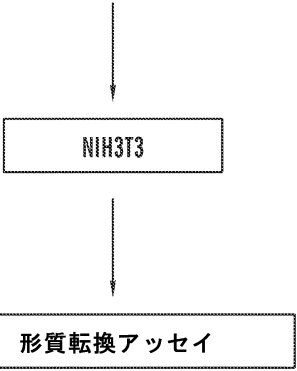


FGFR2-BICC1バリエントの増殖

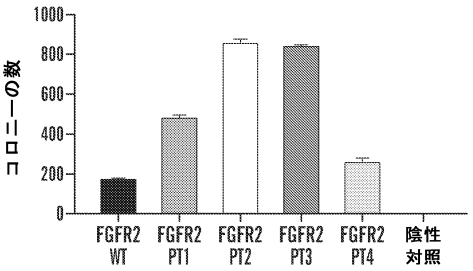
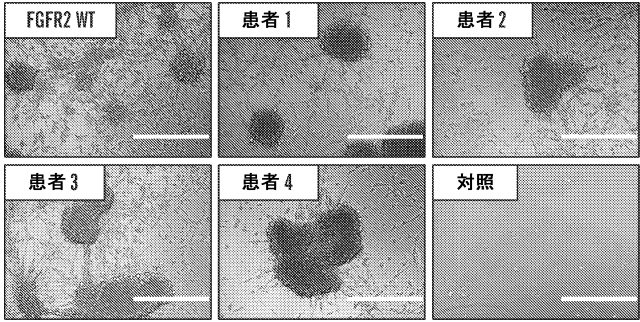


【図 4 E - 1】

患者	タンパク質の変化
患者 #1	I288_E295delinsT
患者 #2	H167_N173del
患者 #3	W290_L312delinsC
患者 #4	W290_I291delinsC



【図 4 E - 2】



10

20

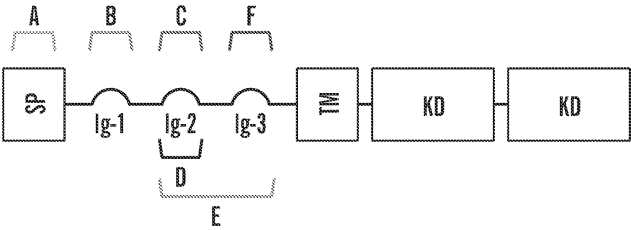
30

40

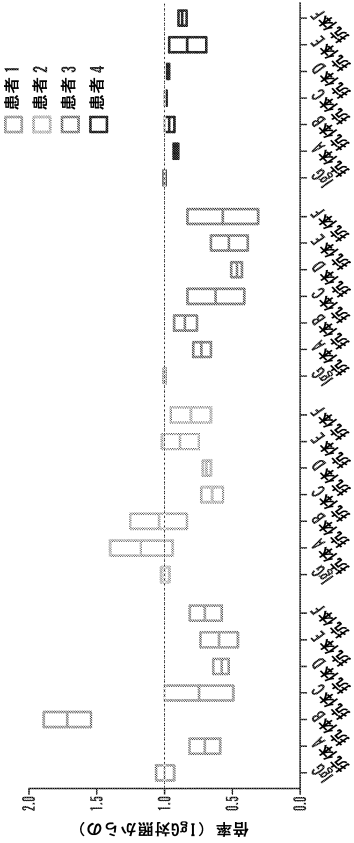
50

【図 4 F - 1】

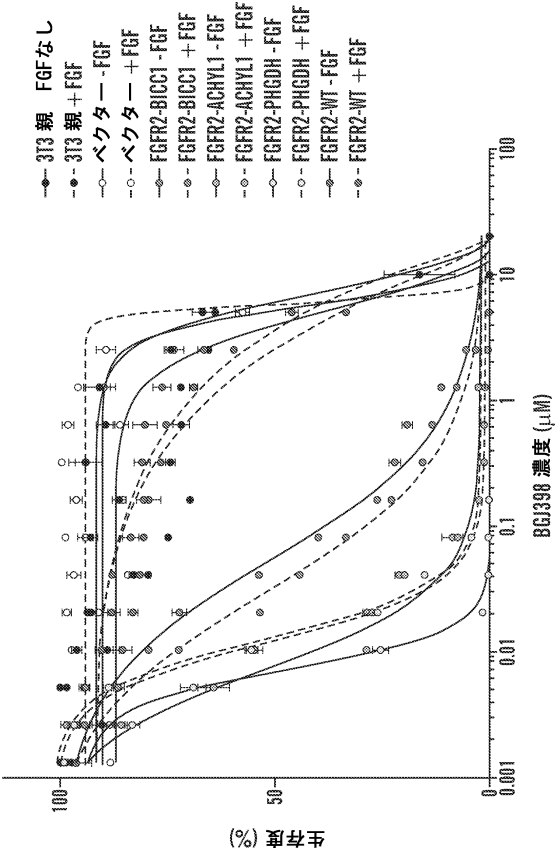
患者	タンパク質の変化
患者 #1	I288_E295delinsT
患者 #2	H167_N173del
患者 #3	W290_L312delinsC
患者 #4	W290_I291delinsC



【図 4 F - 2】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】

IC50 (μM)	-FGF	+FGF
親	7.0	7.0
ベクター	5.7	5.9
FGFR2-BICC1	0.054	0.029
FGFR2-ACHYL1	0.007	0.013
FGFR2-PHGDH	0.007	0.012
FGFR2-WT	5.18	80.62

10

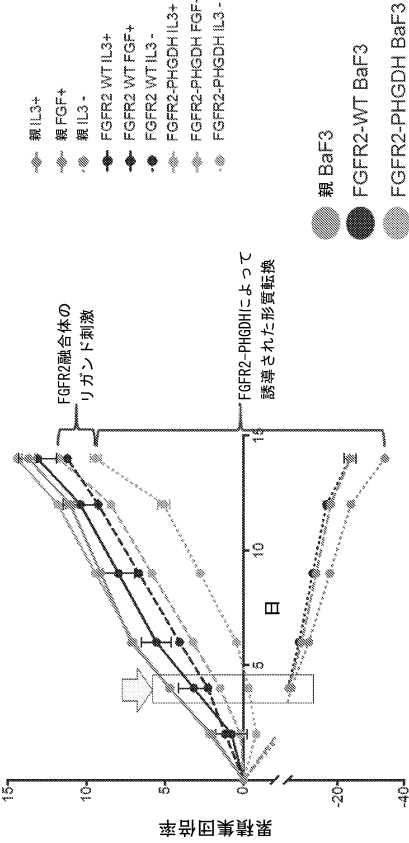
20

30

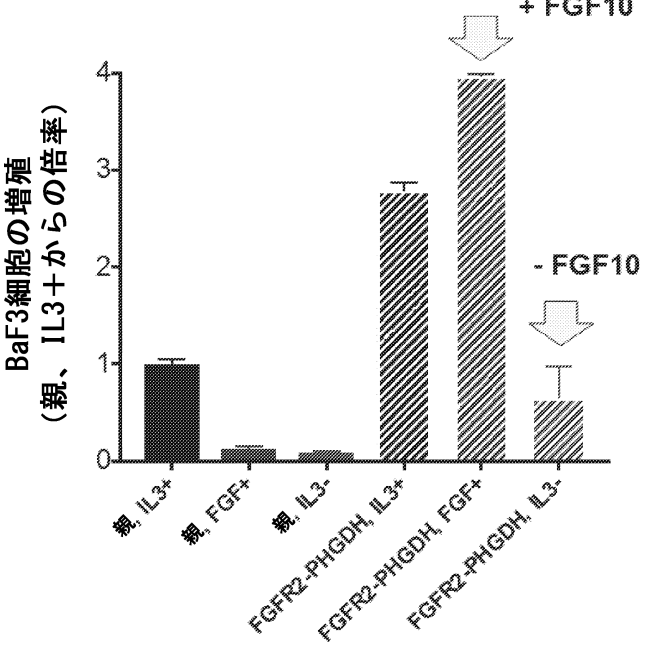
40

50

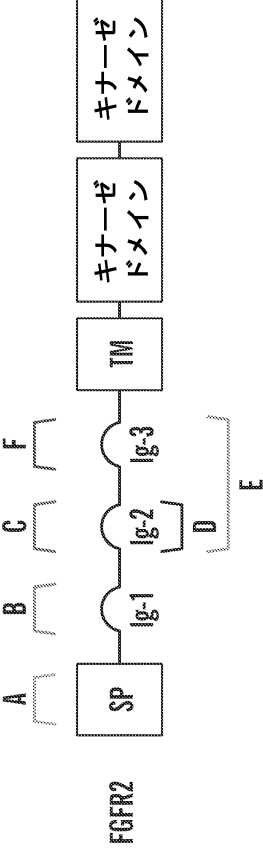
【図 6 A】



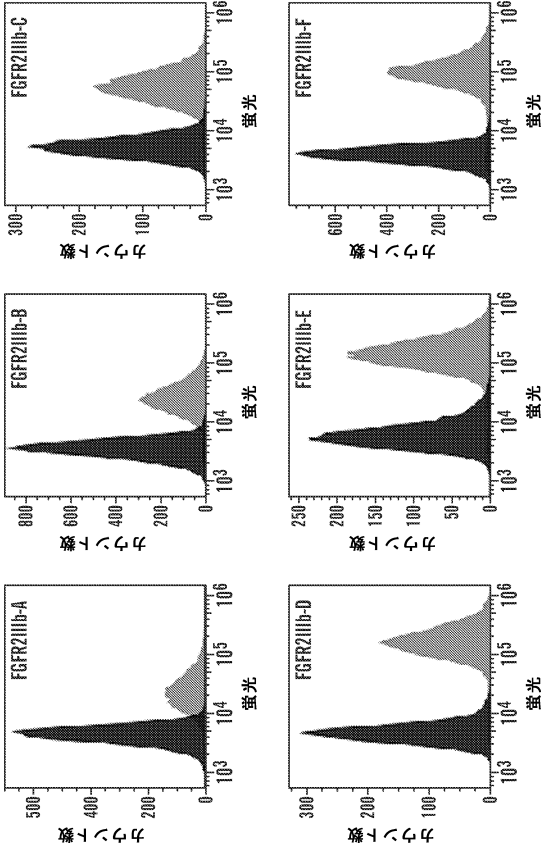
【図 6 B】



【図 7 A - 1】



【図 7 A - 2】



10

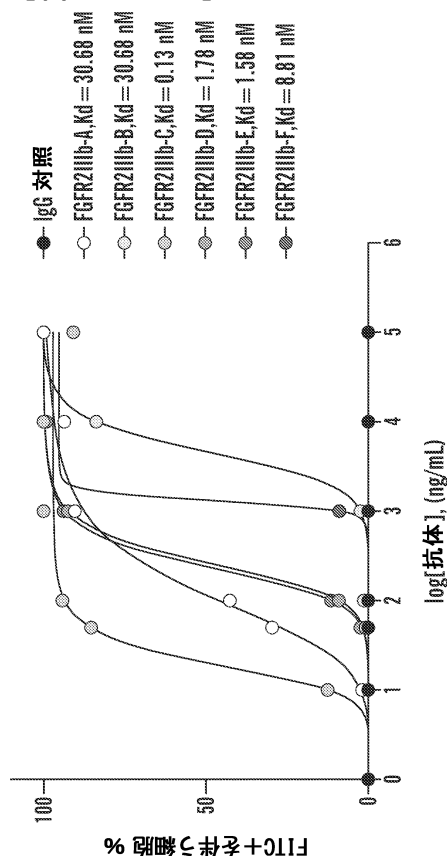
20

30

40

50

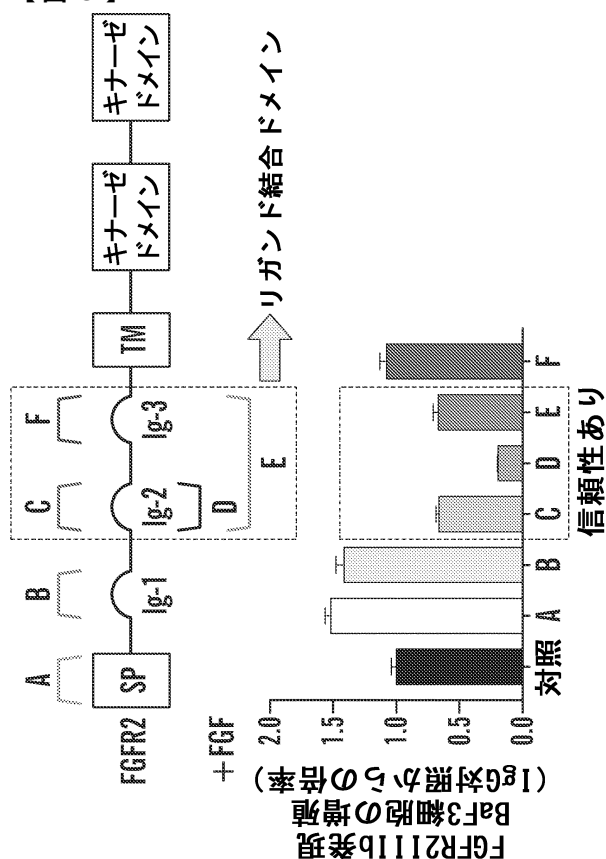
【図 7 A - 3】



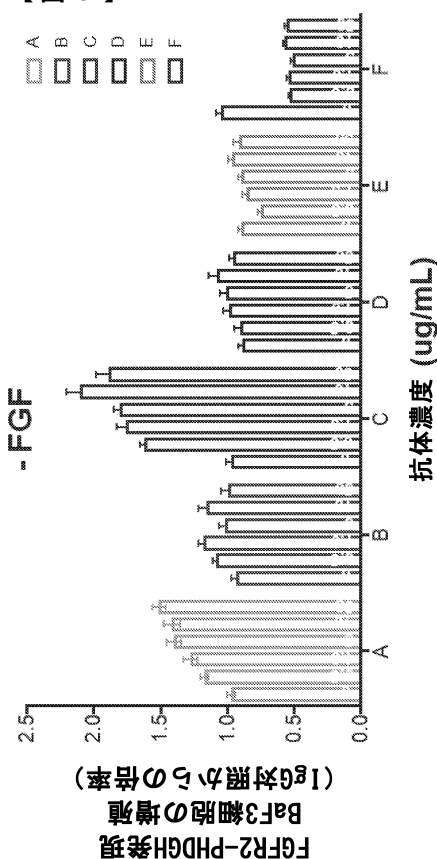
【図 7 B】

抗体	A	B	C	D	E	F
会社	Bayer	Gal23	N10164	GE	GA	N12433
特許における名称	Bayer	Gal23	Novartis	Genentech	Galaxy	Novartis
	M048-P001	GAL-FR23	10164	28.1.3.12	HuGAL-FR21	12433
Kd (nM) (特許)	105	ND	2	3	"少なくとも約1nm"	5.6
Kd (特許)を測定するための方法	間接ELISA-15AA-N末-FGR2	n/a	溶液平衡タイトレーション(ST)/ELISA+EC1-FGR2IIb	ラジオイムノアッセイ精製-FGR211b	ELISA精製-FGR2	溶液平衡タイトレーション(ST)/ELISA+EC1-FGR2IIb
Kd (nM) (FACS)	30.68	30.68	0.13	1.78	1.58	8.81
インビトロ増殖阻害 +FGr10 (6a3i)における -FGr2-PhM9i、4日間のアッセイ	n/a (阻害性 効果なし)	n/a (阻害性 効果なし)	IC50~23.32nM	IC50~1.86nM	IC50~28.92nM	IC50~71.93nM
インビトロ増殖阻害 -FGr10 (6a3i)における -FGr2-PhM9i、4日間のアッセイ	n/a (阻害性 効果なし)	n/a (阻害性 効果なし)	n/a (アゴニスト 効果)	n/a (阻害性 効果なし)	n/a (阻害性 効果なし)	IC50~5.55nM (はっきりしない 傾き)
FGR2結合部位 (FACS による3T3細胞における FGR2-B10C1 FGr10ヤ生機養物)	SP (4倍濃度でも60% でも60%濃度でも60% 以上)	n/a (繰り返し)	lg2	lg2	lg3	lg3

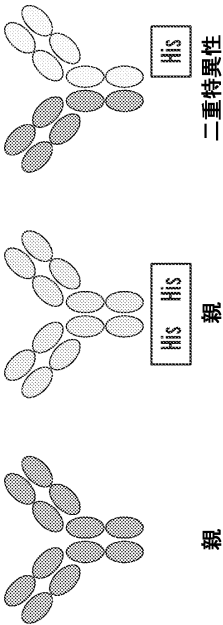
【圖 8】



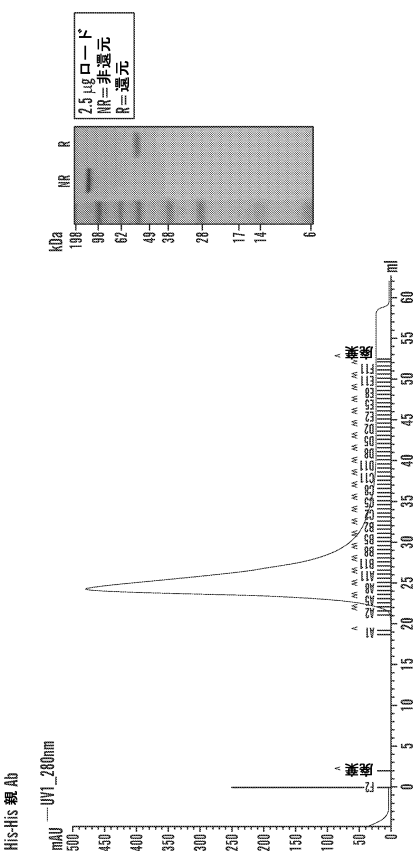
【図 9】



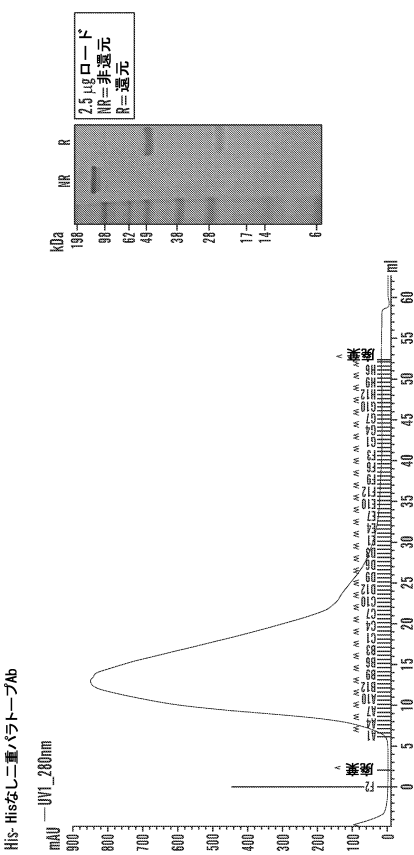
【図 1 1 D - 1】



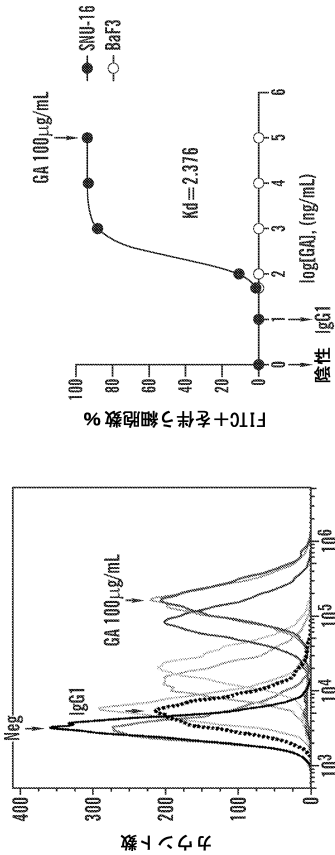
【図 1 1 D - 2】



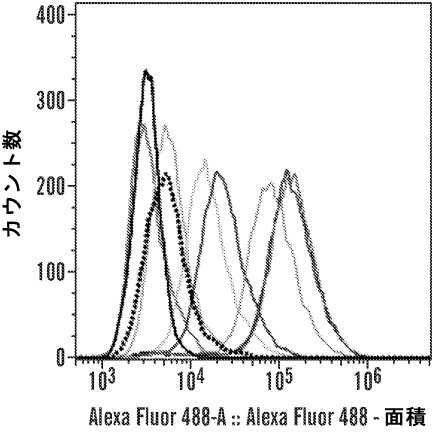
【図 1 1 D - 3】



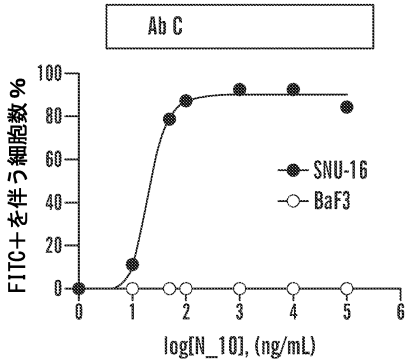
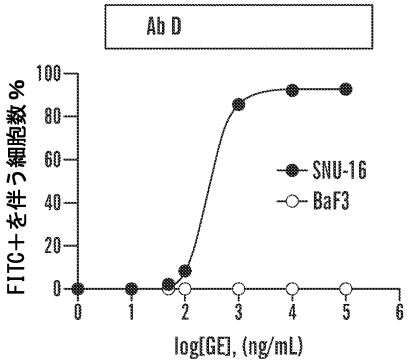
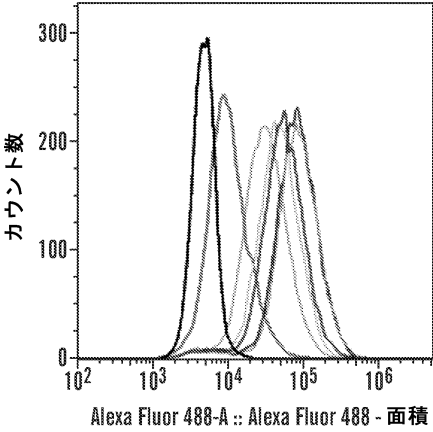
【図 1 2】



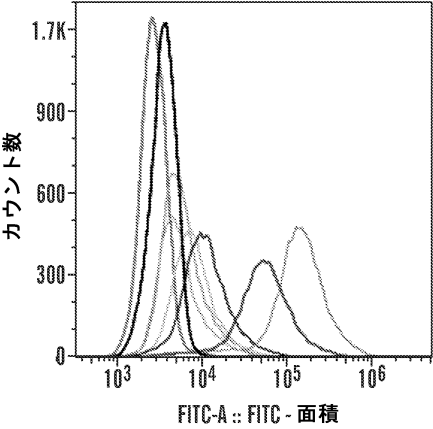
【図 1 3 - 1】



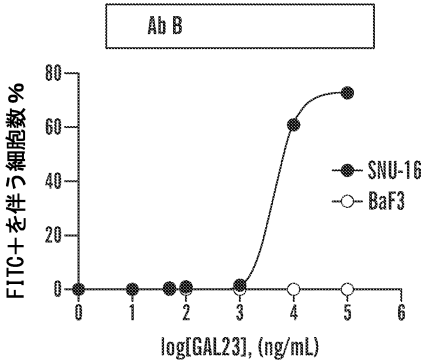
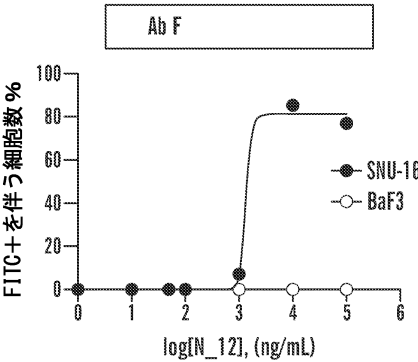
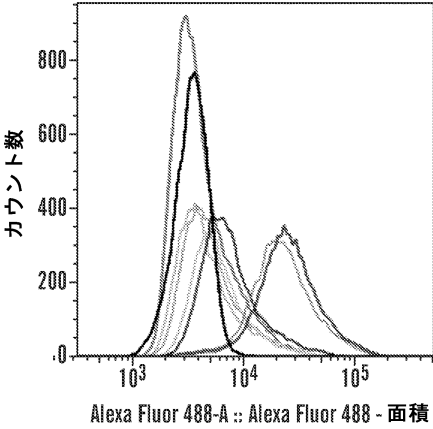
【図 1 3 - 2】



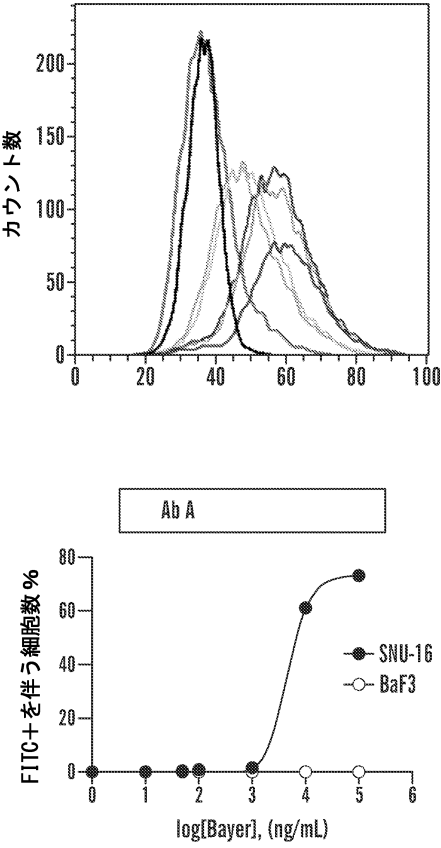
【図 1 3 - 3】



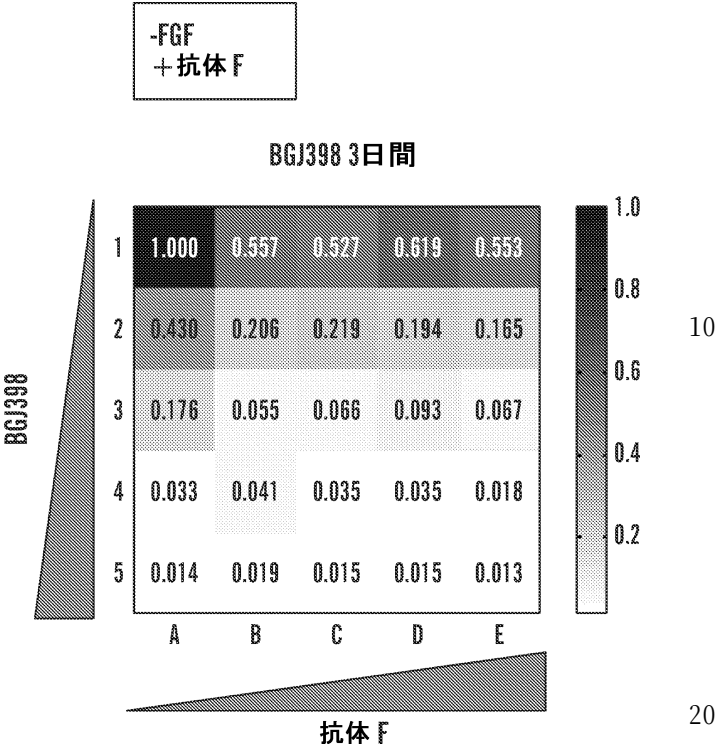
【図 1 3 - 4】



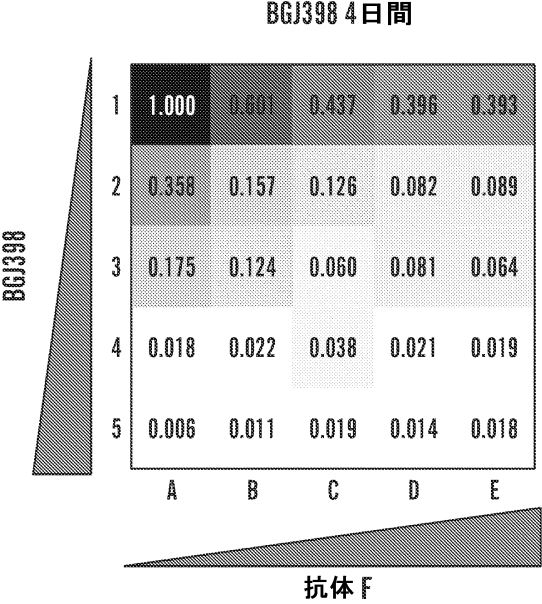
【図 1 3 - 5】



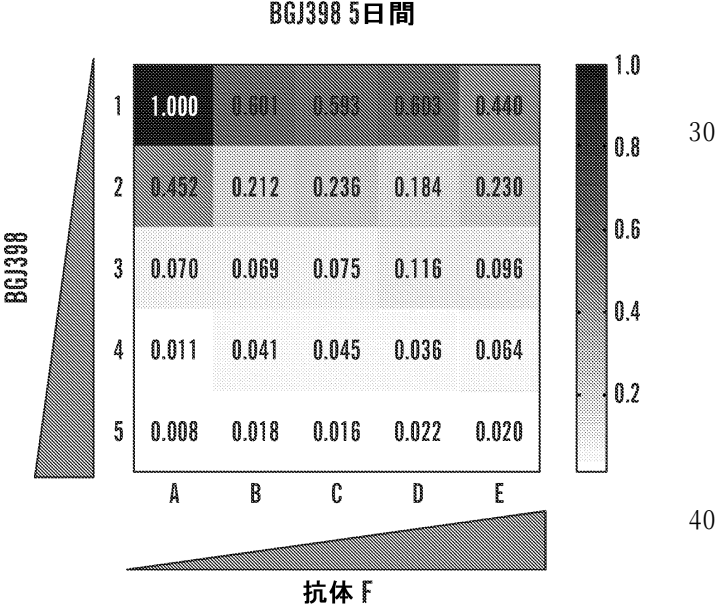
【図 1 4 A - 1】



【図 1 4 A - 2】

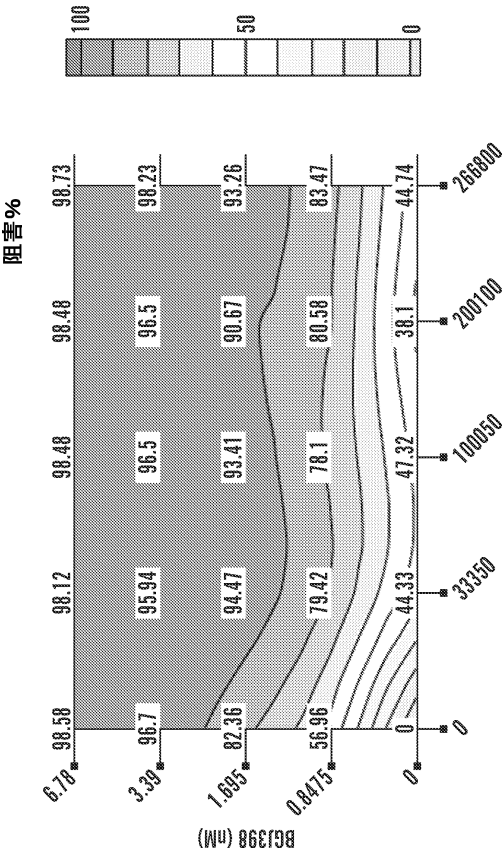


【図 1 4 A - 3】

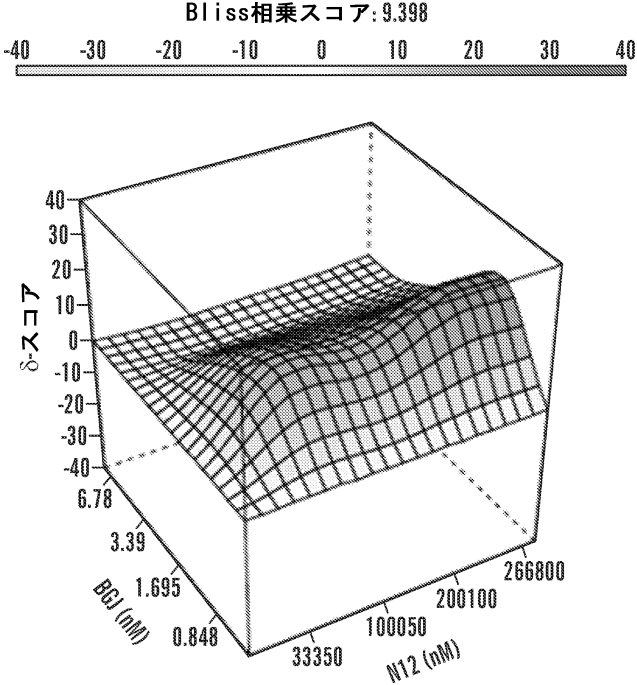


1=100% 生存
0=0% 生存

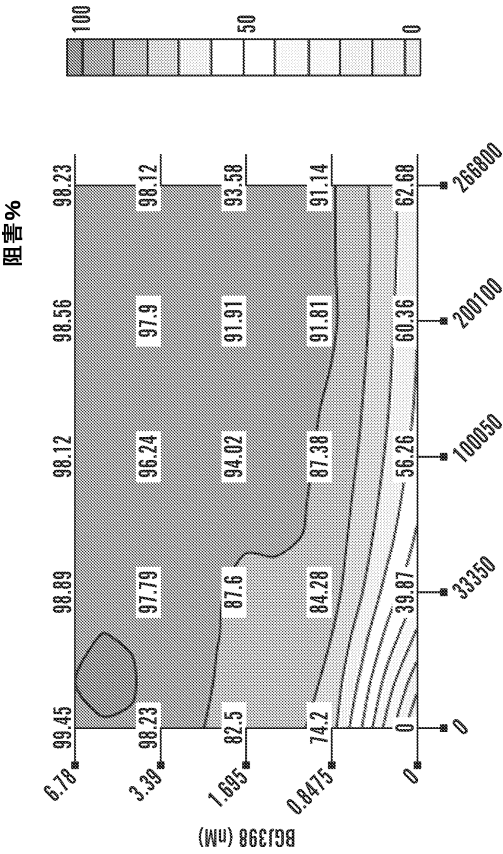
【図 1 4 B - 1】



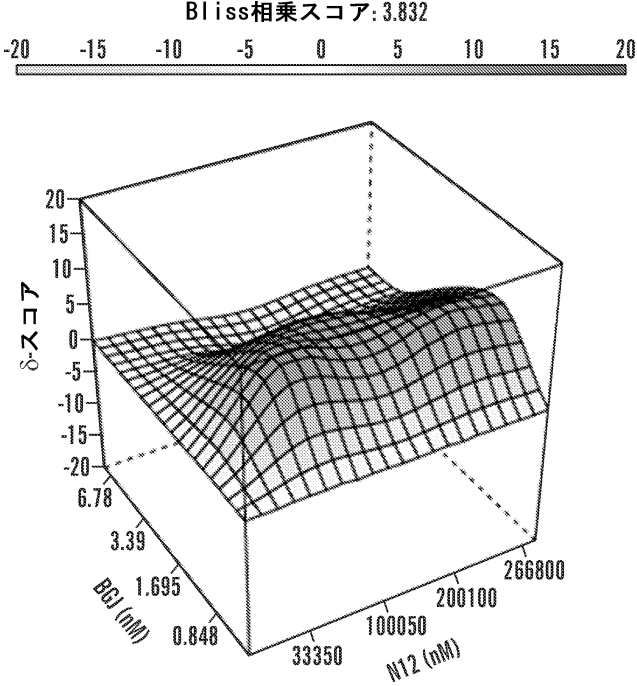
【図 1 4 B - 2】



【図 1 4 C - 1】



【図 1 4 C - 2】



10

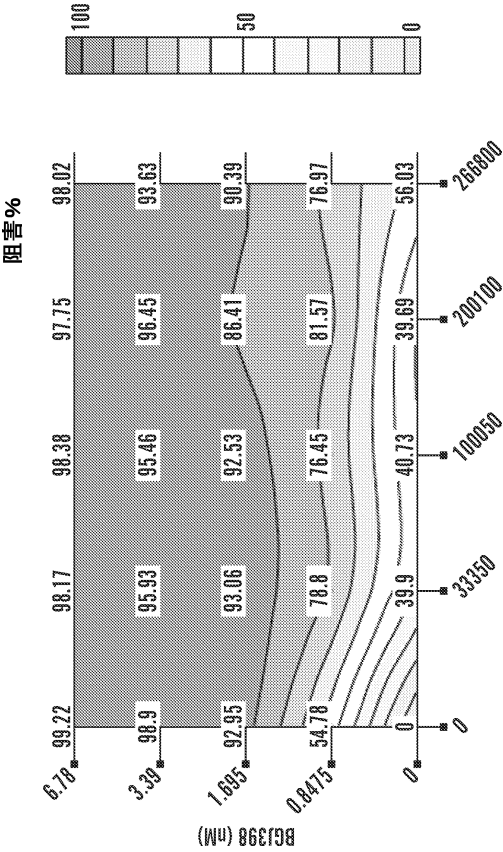
20

30

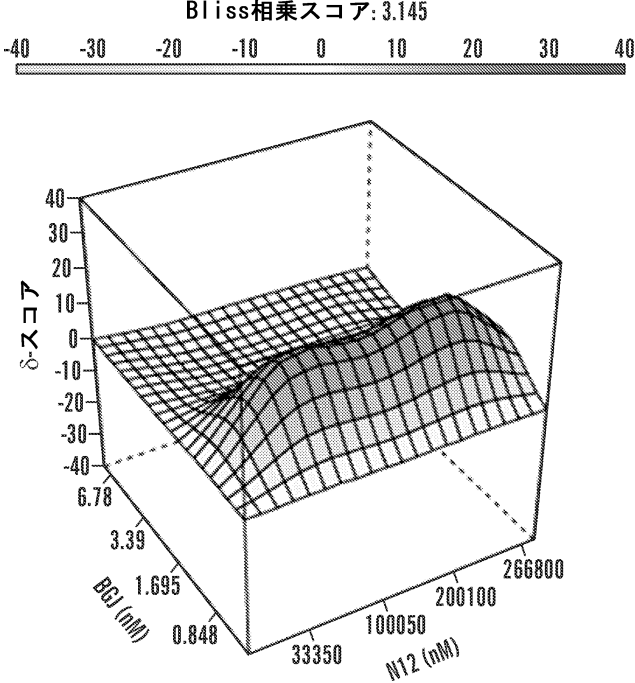
40

50

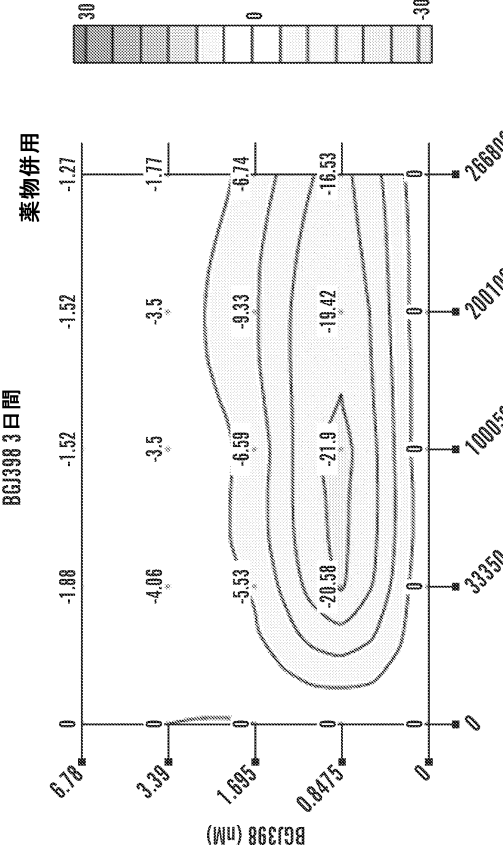
【図 1 4 D - 1】



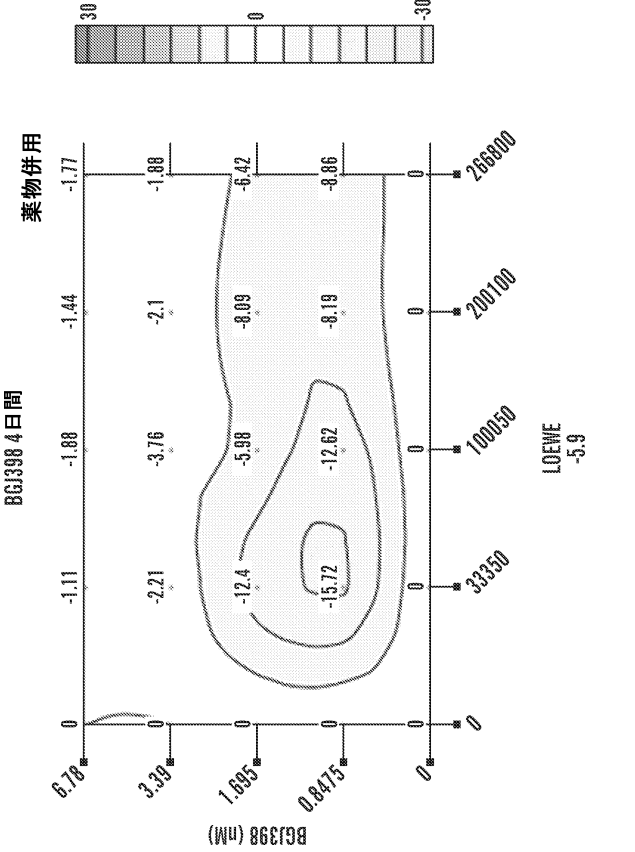
【図 1 4 D - 2】



【図 1 4 E - 1】



【図 1 4 E - 2】



10

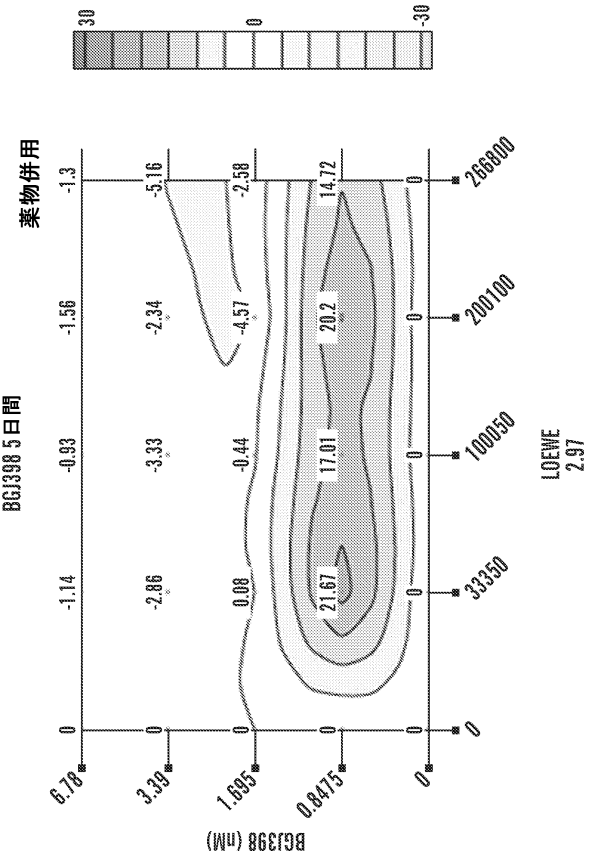
20

30

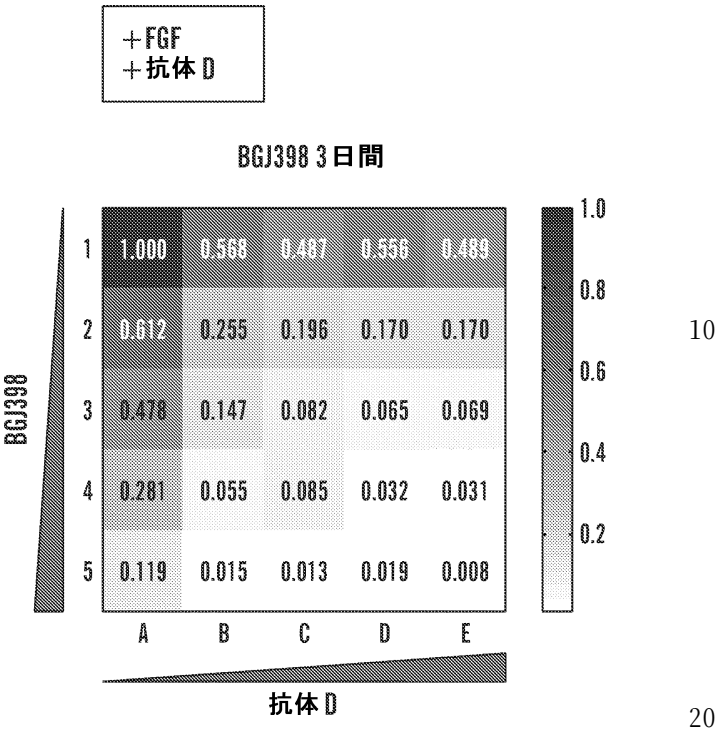
40

50

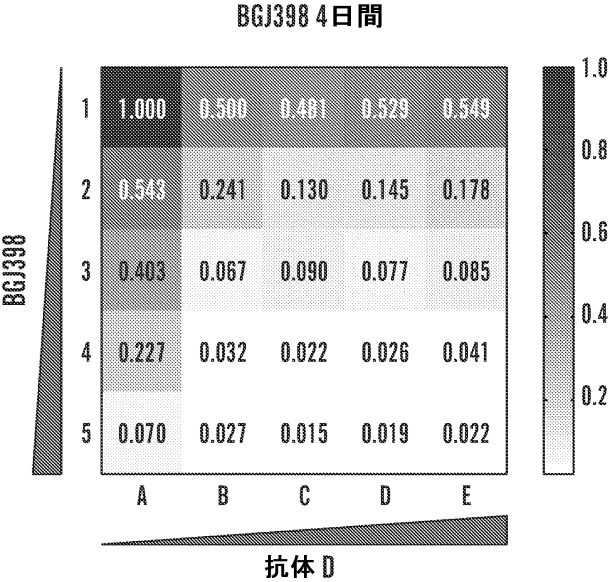
【図 1 4 E - 3】



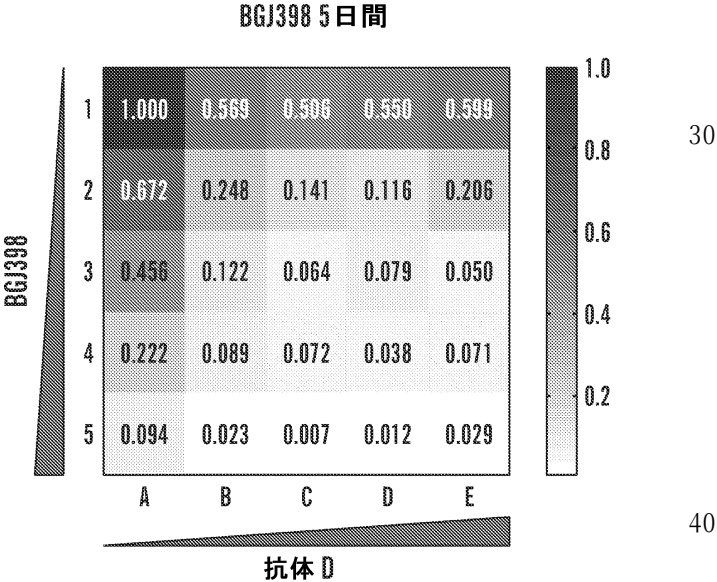
【図 1 5 A - 1】



【図 1 5 A - 2】

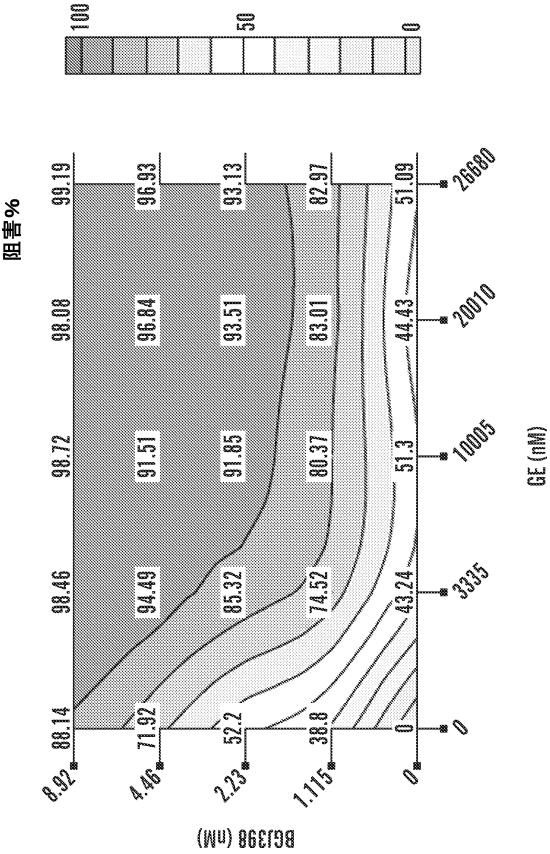


【図 1 5 A - 3】

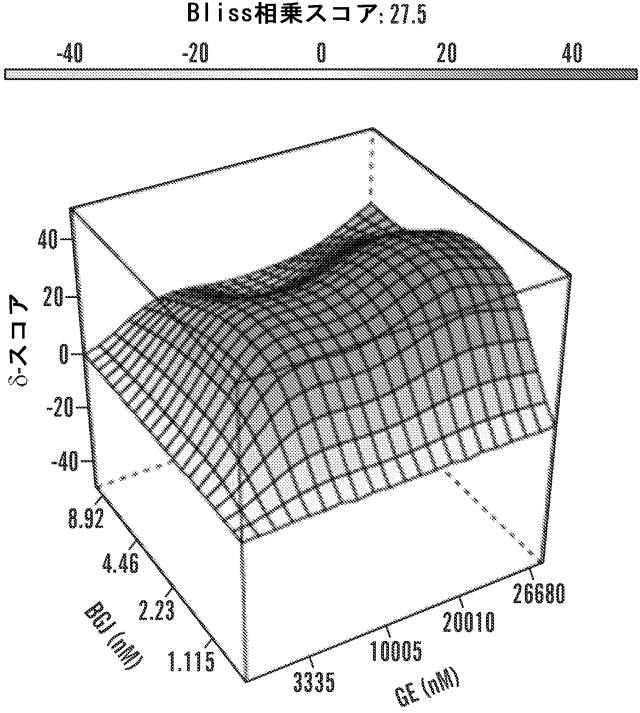


1=100% 生存
0=0% 生存

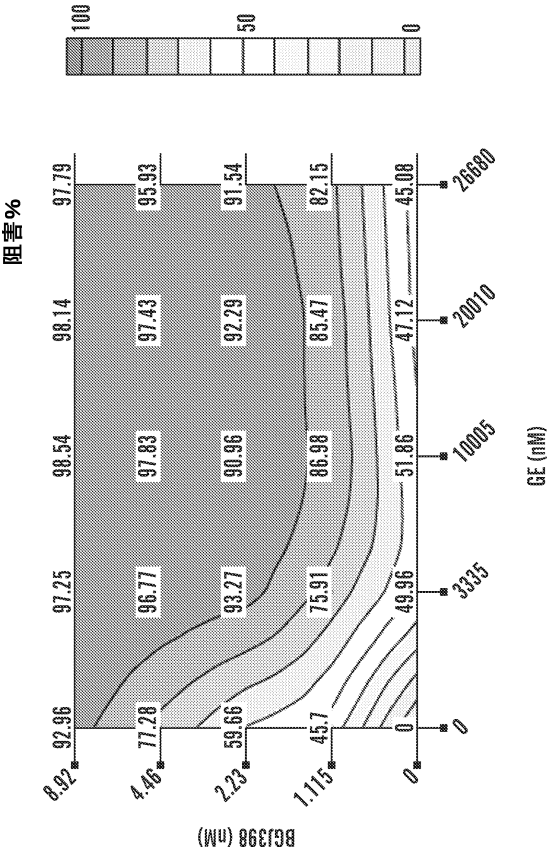
【図 1 5 B - 1】



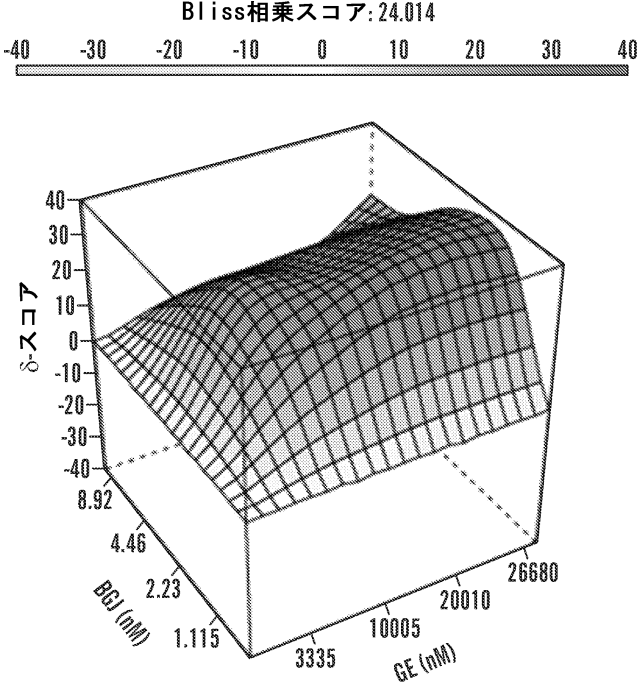
【図 1 5 B - 2】



【図 1 5 C - 1】



【図 1 5 C - 2】



10

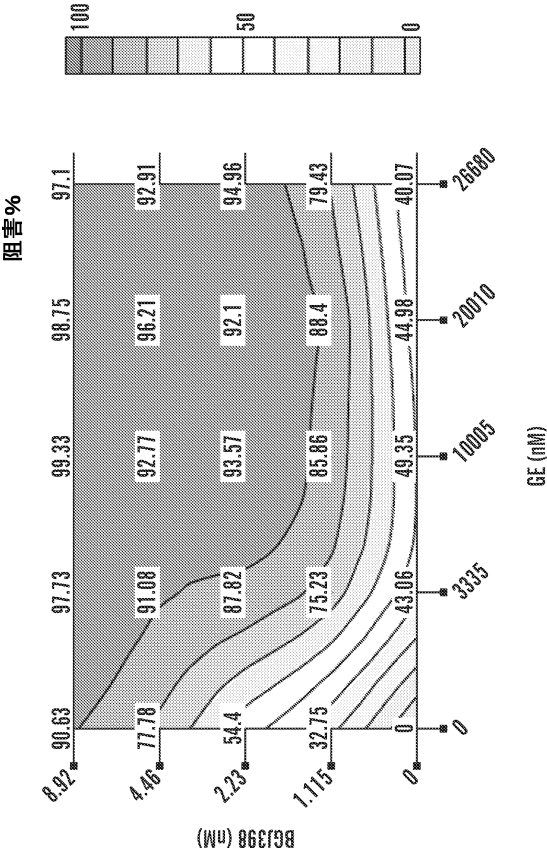
20

30

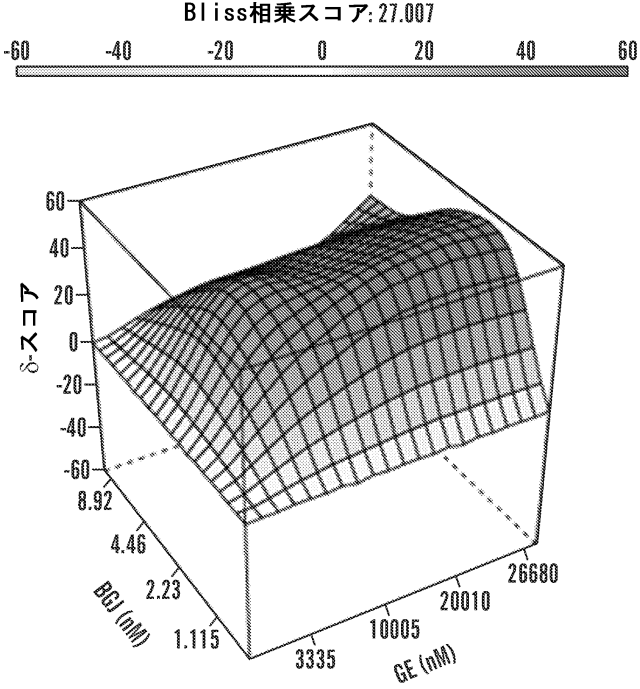
40

50

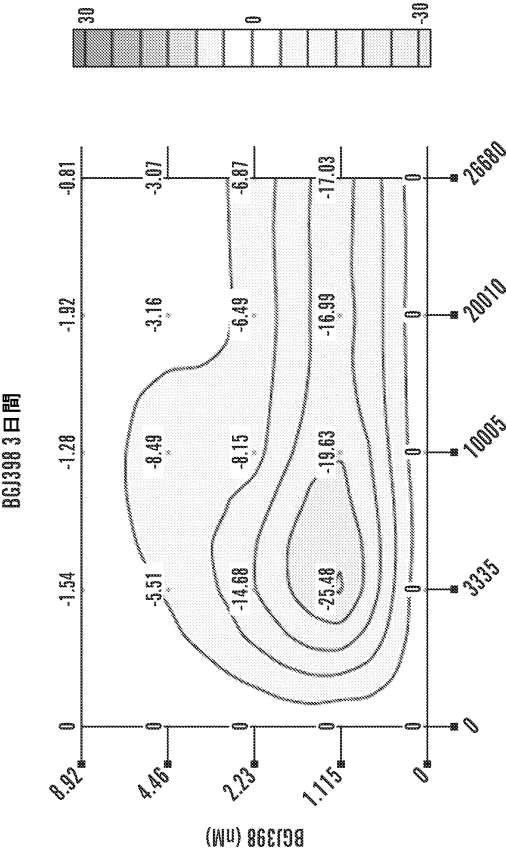
【図 1 5 D - 1】



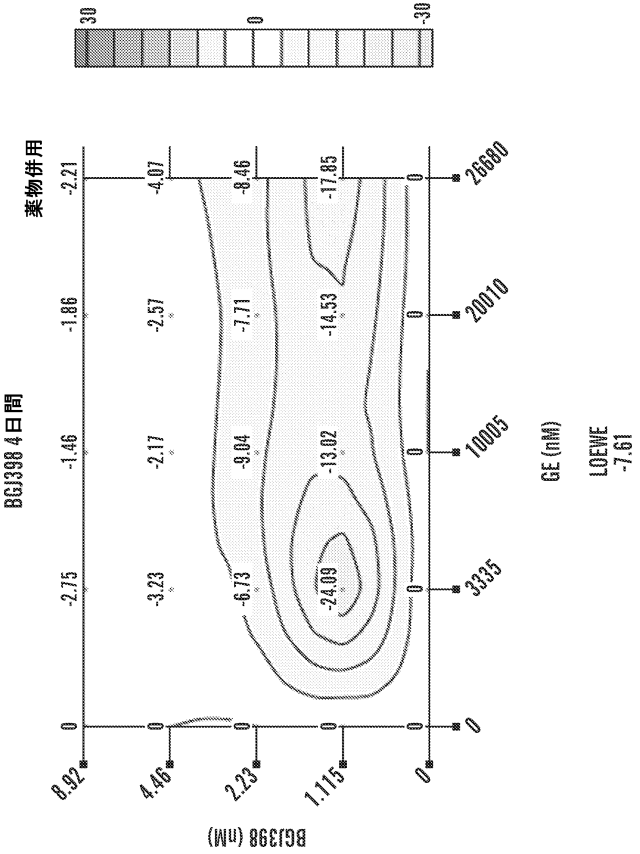
【図 1 5 D - 2】



【図 1 5 E - 1】



【図 1 5 E - 2】



10

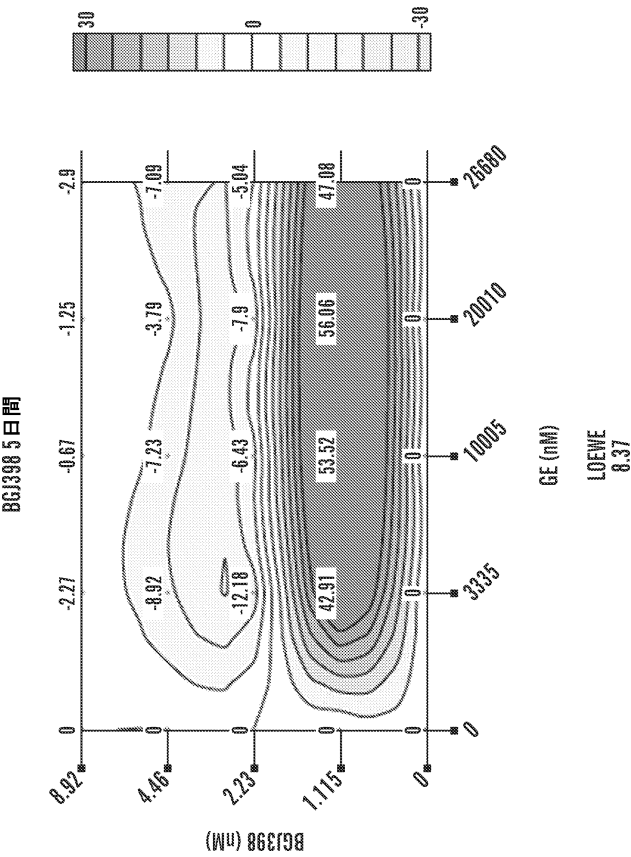
20

30

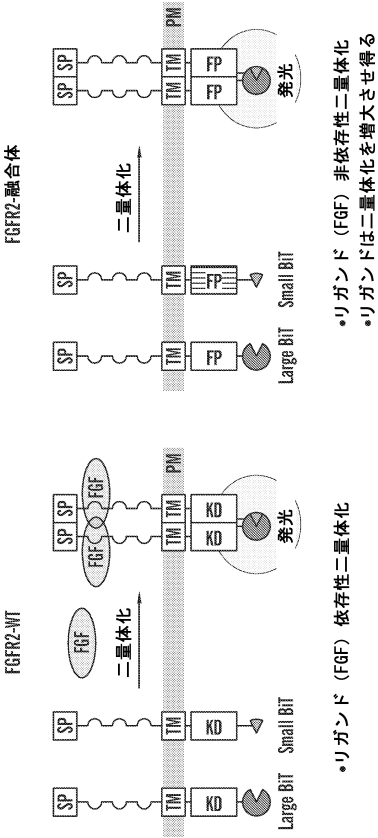
40

50

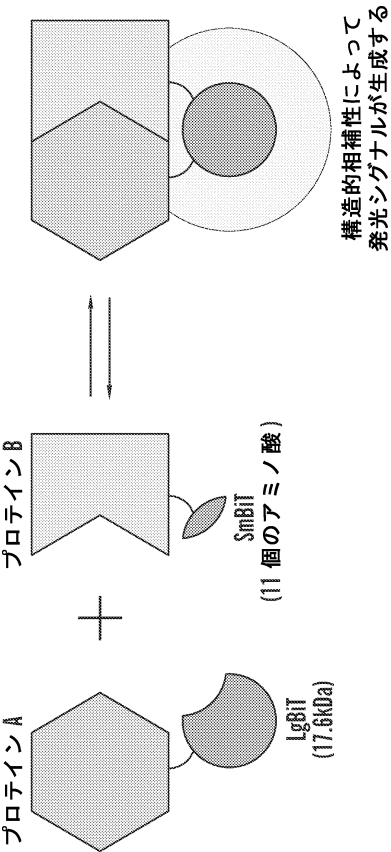
【図 1 5 E - 3】



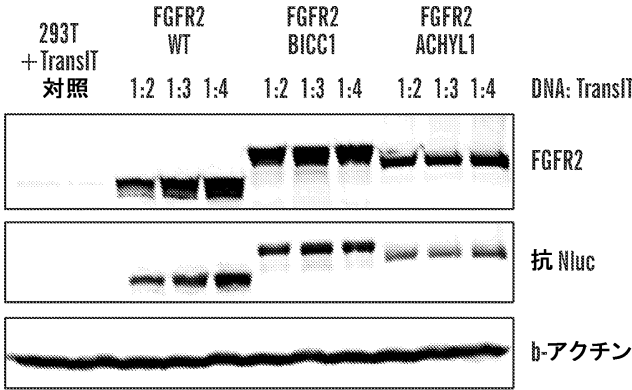
【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



【図 1 6 C - 1】



•293T細胞株において行なわれたアッセイ
•トランスフェクション後3日目

10

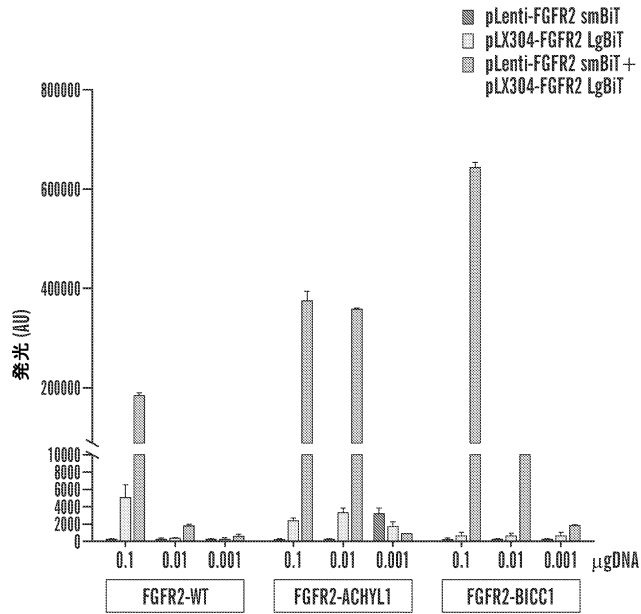
20

30

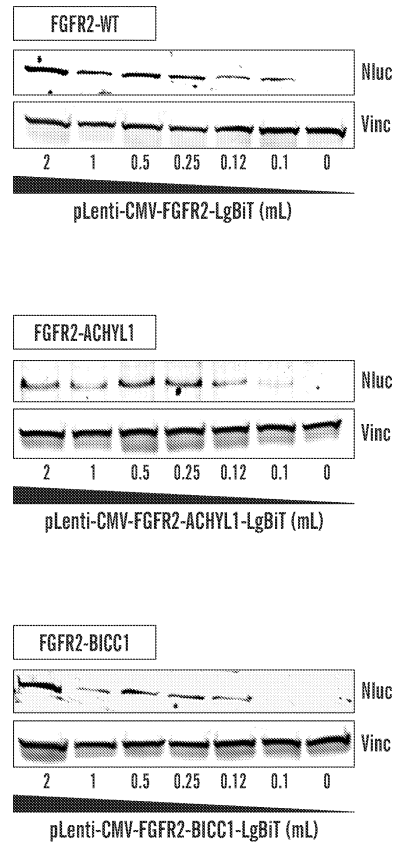
40

50

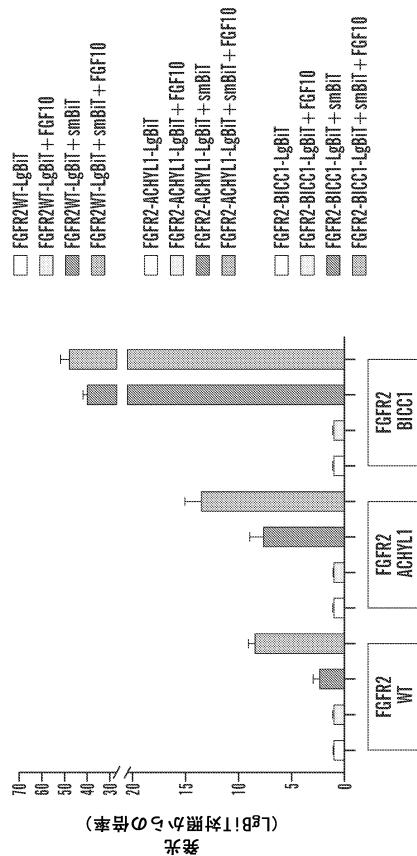
【図 16 C - 2】



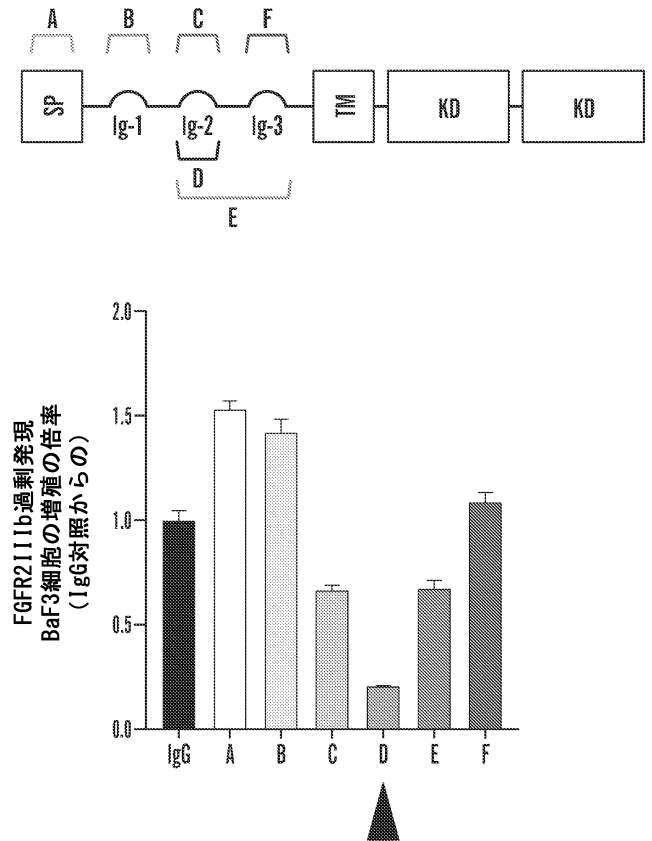
【図 16 D】



【図 16 E】



【図 16 F - 1】



10

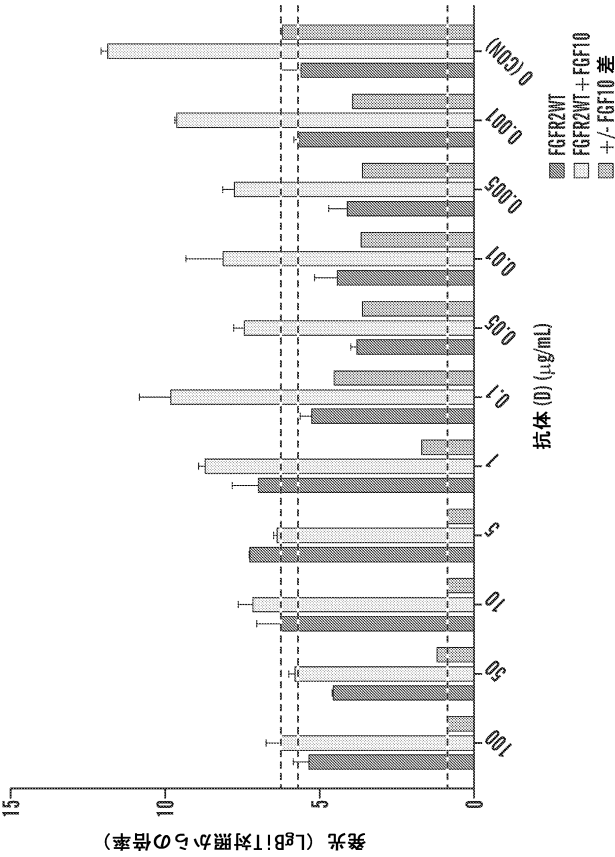
20

30

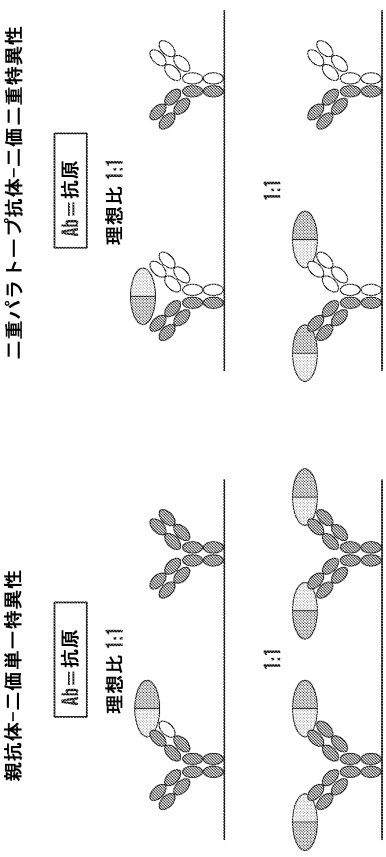
40

50

【図 1 6 F - 2】



【図 1 7 A】



【図 1 7 B】

抗体ランキング	KD (M)	化学量論結合	説明
FGFR_B	1.6E-08	1.7	ヒト IgG1 F409R
FGFR_GA/N_12433	7.7E-09	2.1	ヒト IgG1 F409R
FGFR_N_12433	7.5E-09	2.1	ヒト IgG1 F409R
FGFR_GA	7.5E-09	2.0	ヒト IgG1 F409R
FGFR_Gal23	2.1E-09	1.5	ヒト IgG1 F409R
FGFR_N_10164	1.7E-09	1.9	ヒト IgG1 F409R
FGFR_B/GA	1.3E-09	1.5	二重パラトープ抗体
FGFR_GE_FL	9.9E-10	1.9	二重パラトープ抗体
FGFR_B/N_12433	9.1E-10	1.3	二重パラトープ抗体
FGFR_GA/GE_FL	8.7E-10	1.2	二重パラトープ抗体
FGFR_GA/Gal23	7.7E-10	1.1	二重パラトープ抗体
FGFR_B/Gal23	7.7E-10	1.1	二重パラトープ抗体
FGFR_Gal23/N_12433	6.8E-10	1.1	二重パラトープ抗体
FGFR_B/B_10164	5.3E-10	1.2	二重パラトープ抗体
FGFR_Gal23/GE_FL	5.0E-10	1.0	二重パラトープ抗体
FGFR_GE_FL/N_12433	4.2E-10	1.3	二重パラトープ抗体
FGFR_Gal23/N_10164	3.9E-10	1.0	二重パラトープ抗体
FGFR_B/GE_FL	3.7E-10	1.3	二重パラトープ抗体
FGFR_N_10164/N_12433	2.5E-10	1.3	二重パラトープ抗体

【図 1 7 C】

抗体	FGFR_B	FGFR_GA	FGFR_Gal23	FGFR_GE_FL	FGFR_N_10164	FGFR_N_12433
FGFR_B	1.6E-08	1.3E-09	7.7E-10	3.7E-10	5.3E-10	8.2E-10
FGFR_GA		7.5E-09	7.7E-10	8.7E-10	3.9E-10	7.7E-09
FGFR_Gal23			2.1E-09	5.0E-10	3.9E-10	6.8E-10
FGFR_GE_FL				9.9E-10	1.7E-09	4.2E-10
FGFR_N_10164						2.5E-10
FGFR_N_12433						7.5E-09

10

20

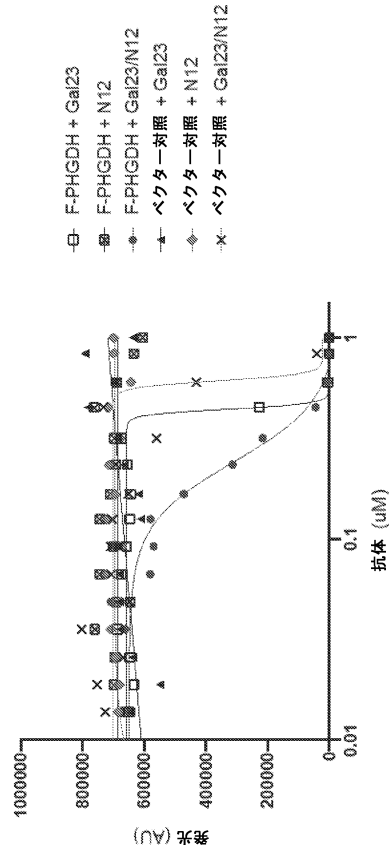
30

40

50

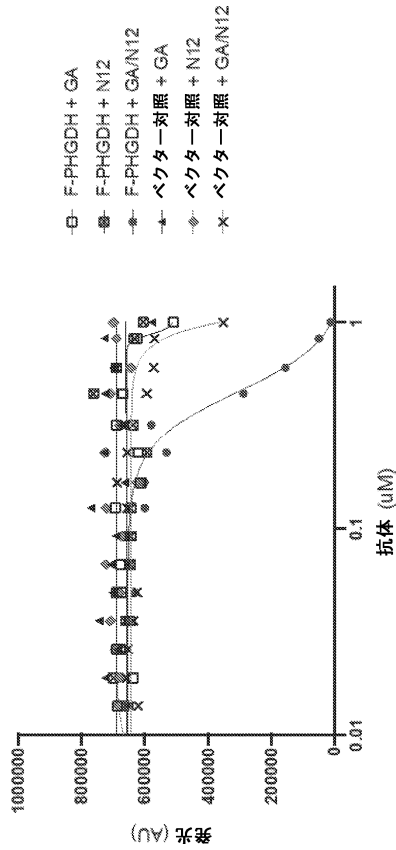
二重パレート抗体 Gal23/N12

【図 1 8 C】



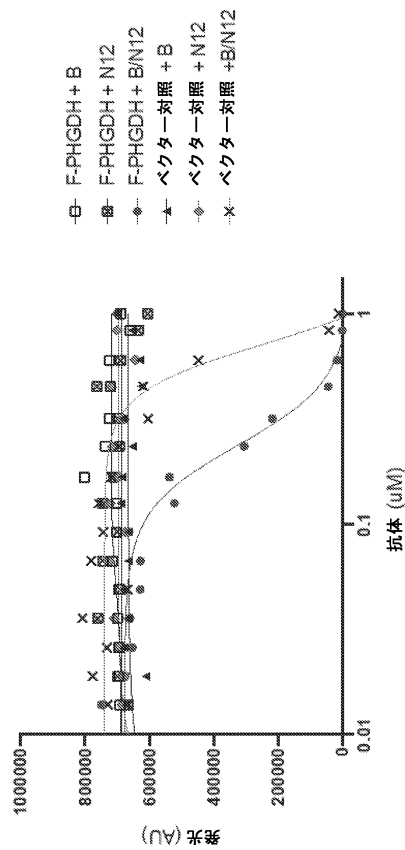
二重パレート抗体 GAN12

【図 1 8 A】



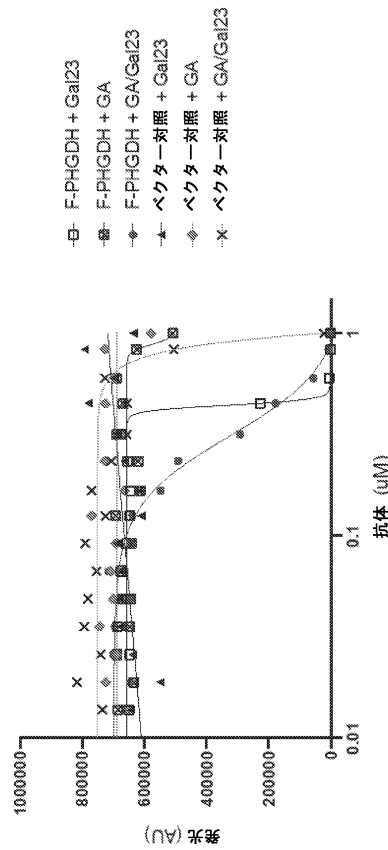
二重パレート抗体 B/N12

【図 1 8 D】

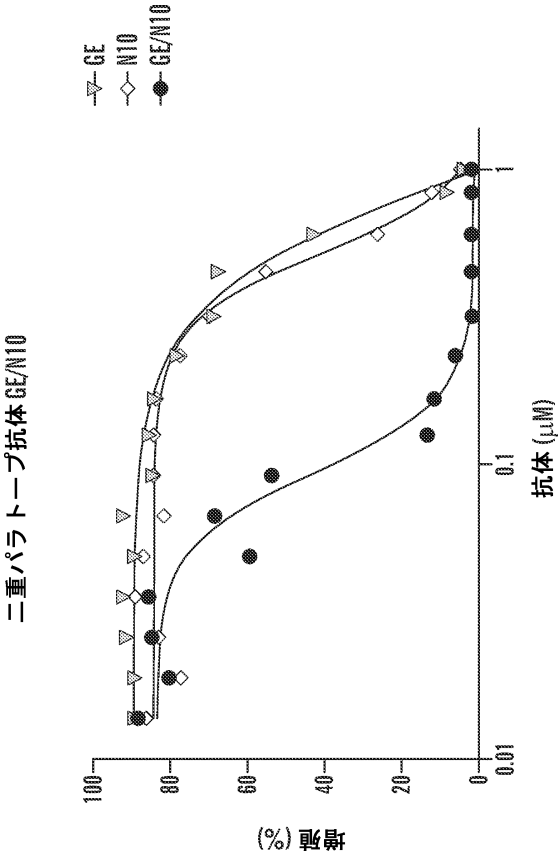


二重パレート抗体 GA/Gal23

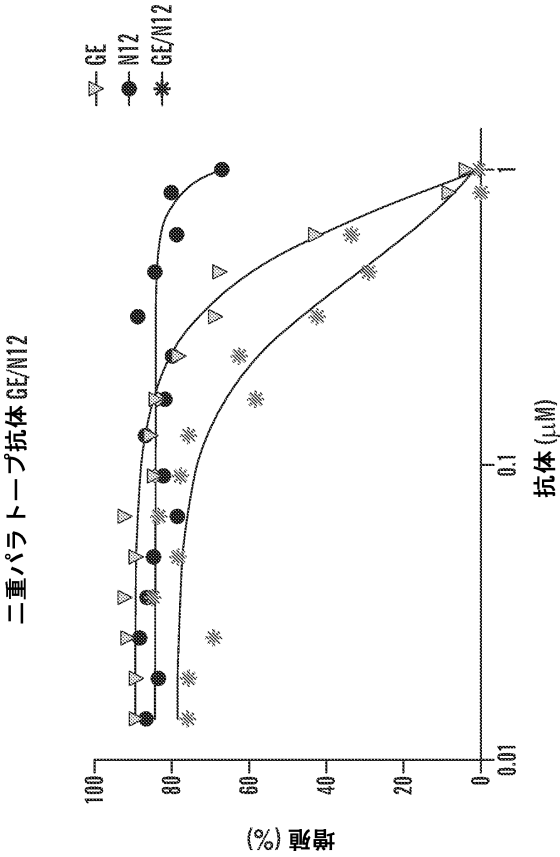
【図 1 8 B】



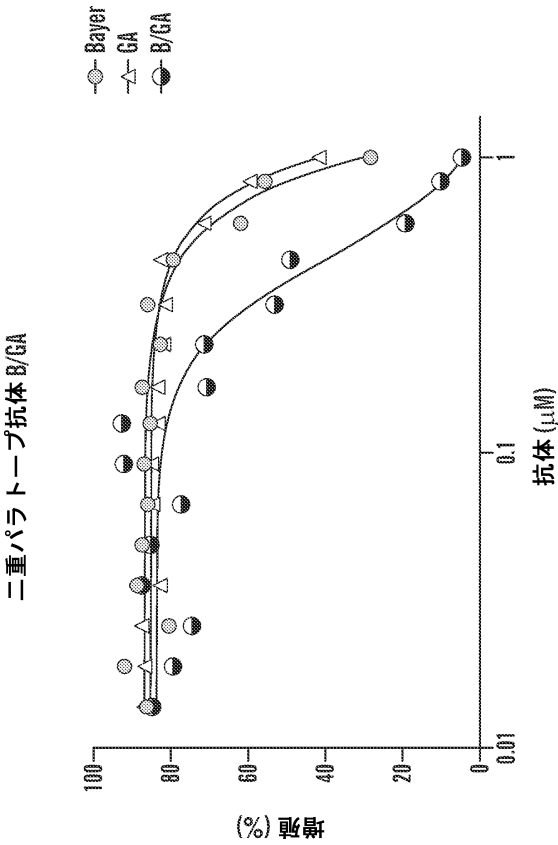
【図 19 A】



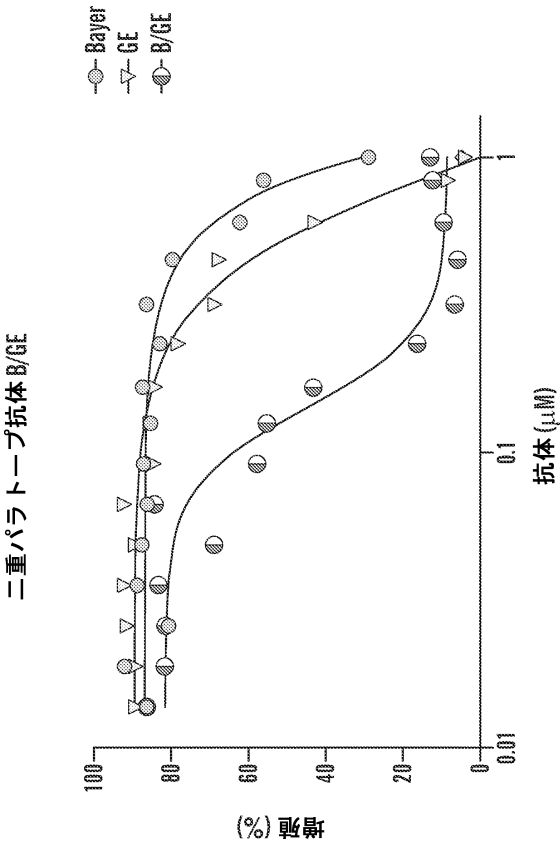
【図 19 B】



【図 19 C】



【図 19 D】



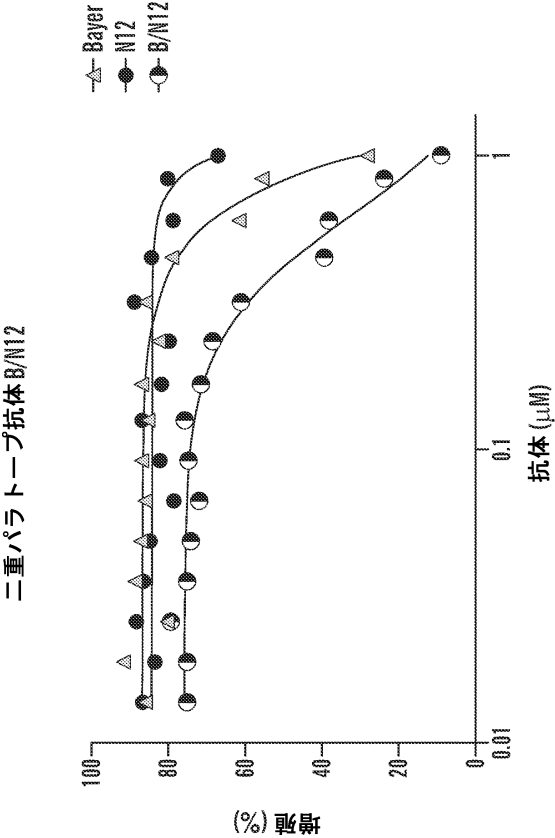
二重パレート抗体 GE/N10

二重パレート抗体 GE/N12

二重パレート抗体 B/GA

二重パレート抗体 B/GE

【図 19 E】



10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年2月3日(2023.2.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2023528454000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/35468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/00, A61K 39/39, A61P 35/00, C07K 16/30 (2021.01)

CPC - C07K 16/2863, A61K 39/3955, A61K 2039/505, C07K 2317/34, C07K 2317/55, C07K 2317/565

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0322220 A1 (BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH) 30 October 2014 (30.10.2014) Abstract; Claim 2; Claim 5; Claim 6; Claim 7; Claim 9; para [0021]; para [0025]; para [0032]; para [0057]; para [0064]; para [0073]; para [0104]; para [0375]; para [0441]; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32	1-17, 19-20
A	US 8,501,191 B2 (BOSCH et al.) 8 August 2013 (06.08.2013) Abstract	1-17, 19-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2021

Date of mailing of the international search report

NOV 12 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/35468

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/35468

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 18, 21-27, 31-44
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---Please see continuation in first extra sheet---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-17, 19-20, limited to M048-D01 and GAL-FR23

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/35468

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-17, 19-20, directed to a polypeptide or antibody that specifically binds two epitopes in the extracellular domain of a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). The polypeptide or antibody will be searched to the extent that the polypeptide or antibody encompasses two antigen binding fragments of anti-FGFR2 antibodies selected from the group consisting of M048-D01 and GAL-FR23 (note, these are the first claimed anti-FGFR2 antibodies for the inventive polypeptide or antibody embodiment). It is believed that claims 1-17, 19-20 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the polypeptide or antibody encompasses two antigen binding fragments of anti-FGFR2 antibodies selected from the group consisting of M048-D01 and GAL-FR23. Additional polypeptide or antibody polypeptide(s) comprising additional combination(s) of paratope(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected polypeptide or antibody polypeptide(s) comprising additional combination(s) of paratope(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a polypeptide or antibody that specifically binds two epitopes in the extracellular domain of a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) comprising two antigen binding fragments of anti-FGFR2 antibodies selected from the group consisting of M048-D01 and 10164 (claims 1-17, 19-20).

Group II, claims 28-30, directed to a method of treating cholangiocarcinoma in a subject.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.

Additionally, Group I+ has the special technical feature of a polypeptide or antibody that specifically binds two epitopes in the extracellular domain of a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a method of treating cholangiocarcinoma in a subject, that is not required by Group I+.

Common technical features

No technical features are shared between the antibody amino acid sequences of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II were considered to share the technical features of including: a biparatopic antibody that specifically binds two epitopes in the extracellular domain of a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), comprising antigen binding fragments of an antibody selected from the group consisting of M048-D01, GALFR23, 10164, 2B 1.3.12, GAL-FR21, or 12433; these shared technical features are made obvious by US 2014/0322220 A1 to Bayer Intellectual Property GmbH (hereinafter 'Bayer').

Bayer teaches a plurality of antibodies that specifically bind distinct epitopes in the extracellular domain of a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), comprising antigen binding fragments of an antibody selected from the group consisting of M048-D01 and GALFR23 (Claim 2 - 'An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof specifically binding to the extracellular N-terminal epitope (1RPSFSLVEDTTLEPE15) of FGFR2 as presented by SEQ ID NO:63'; Claim 5 - 'The antibody or antigen-binding fragment according to any one of claims 1 to 4, wherein the antibody or antigen-binding fragment competes in binding to FGFR2 with at least one antibody selected from the group "M048-D01", "M047-D08", "M017-B02", "M021-H02", "M054-A05", "M054-D03", "TPP-1397", "TPP-1398", "TPP-1399", "TPP-1400", "TPP-1401", "TPP-1402", "TPP-1403", "TPP-1406", "TPP-1407", "TPP-1408", "TPP-1409", "TPP-1410", "TPP-1411", "TPP-1412", and "TPP-1415"; para [0441] - 'In contrast, after pre-incubation the monomeric FGFR2 (10 nM) with GAL-FR22 and GAL-FR23, but not with GAL-FR21, the amount of detectable FGFR2 appeared to be significantly increased ... Gal-FR22 binds to an epitope in D2-D3IIIa, and GAL-FR23 binds to one all or partly located in D1'). Since Bayer teaches generating variants of antibodies with improved antigen binding (para [0430] - 'Provided in Table 10 are several examples of variants with amino acid substitutions generated in the heavy and light chains of M048-D01 (TPP-1403). All variants showed strong improvement in antigen binding evaluated in two ELISA formats with different forms of antigen compared to the non CDR changed variant (Table 11).'), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that paratopes from two distinct antibodies could be combined to create a polypeptide with improved binding to two distinct epitopes of FGFR2.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 18, 21-27, 31-44 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/09	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	31/5377(2006.01)	A 6 1 K	31/5377	
A 6 1 K	31/506(2006.01)	A 6 1 K	31/506	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
		A 6 1 K	39/395	N

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャトゥランタブト サイルーデ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メイン ストリート 4 1 5 ザ
ブロード インスティテュート インコーポレイテッド内

(72)発明者 セラーズ ウィリアム

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メイン ストリート 4 1 5 ザ
ブロード インスティテュート インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA91X AA92Y AA93X AA94Y AB01 AC12 AC14 BA01 CA25 CA44

F ターム (参考)	4C085	AA13 BB11 EE01 EE03
	4C086	AA01 AA02 BC50 CB09 GA07 GA12 MA02 MA04 NA05 ZB26
		ZC20 ZC75
	4H045	AA11 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74