

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-516511

(P2014-516511A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 15/02 (2006.01)	C 12 N 15/00	C 4 B 0 6 4
C 12 P 21/08 (2006.01)	C 12 P 21/08	4 B 0 6 5
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 C 0 8 4
C 07 K 14/705 (2006.01)	C 07 K 14/705	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-504018 (P2014-504018)	(71) 出願人	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成24年4月6日 (2012.4.6)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月9日 (2013.12.9)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/032491	(72) 発明者	デニス, マーク アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, ジェネンテック, インコーポレイテッド
(87) 國際公開番号	W02012/138975		
(87) 國際公開日	平成24年10月11日 (2012.10.11)		
(31) 優先権主張番号	61/473,106		
(32) 優先日	平成23年4月7日 (2011.4.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

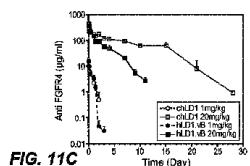
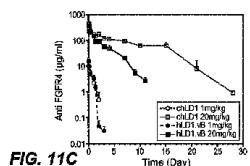
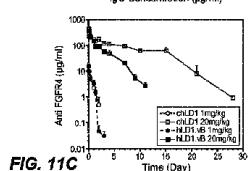
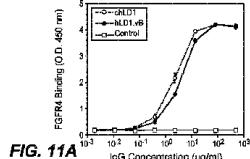
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗FGFR4抗体及び使用方法

(57) 【要約】

発明は抗FGFR4抗体及びその使用方法を提供する

。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗 F G F R 4 抗体が 1 nM の親和性でヒト F G F R 4 に結合する、 F G F R 4 に結合する単離された抗体。

【請求項 2】

抗 F G F R 4 抗体が 1 nM の親和性でヒト、マウス及びカニクイザル F G F R 4 に結合する請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

抗 F G F R 4 抗体が 0.05 nM の親和性でヒト F G F R 4 に結合する請求項 2 に記載の単離された抗体。

【請求項 4】

抗 F G F R 4 抗体が図 12D に示すアミノ酸配列を有するマウス C 3 タンパク質に実質的に結合しない請求項 1 - 3 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 5】

抗 F G F R 4 抗体が G 165A 変異を含んでなるヒト F G F R 4 に実質的に結合しない請求項 1 - 4 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 6】

抗 F G F R 4 抗体がアミノ酸番号 150 ~ 170 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなるか、から基本的に成るか又はから成る配列と少なくとも 70%、80%、90%、95%、98% の配列同一性又は類似性を有するポリペプチドに結合する請求項 1 - 5 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 7】

抗 F G F R 4 抗体がアミノ酸番号 150 ~ 170 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなるか、から基本的に成るか又はからなるポリペプチドに結合する請求項 6 に記載の単離された抗体。

【請求項 8】

抗 F G F R 4 が F G F R 4 活性のアンタゴニストである請求項 1 - 7 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

F G F R 4 活性が F G F 誘導細胞増殖、 F G F R 4 への F G F 結合、 F G F 19 に曝露された細胞における C Y P 7 7 発現の G F 19 - 媒介阻害、又は F G F 19 - 誘導コロニー形成である請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

F G F R 4 に対する F G F 1 及び / 又は F G F 19 結合が阻害される請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

F G F R 4 に対する F G F 1 結合の阻害の I C 50 が約 0.10 nM であり、 F G F R 4 に対する F G F 19 結合の阻害の I C 50 が約 0.10 nM である請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

モノクローナル抗体である請求項 1 - 11 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である請求項 1 - 11 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

F G F R 4 に結合する抗体断片である請求項 1 - 11 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

抗体が (a) 配列番号 : 3 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 3 、 (b) 配列番号 : 6 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 3 、及び (c) 配列番号 : 2 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 2 を含む請求項 1 - 14 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

抗体が(a)配列番号：1のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H1(b)配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H2、及び(c)配列番号：3のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H3を含む請求項1-14の何れか一項に記載の抗体。

【請求項17】

(a)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1；(b)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2；及び(c)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3をさらに含んでなる請求項16に記載の抗体。

【請求項18】

(a)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1；(b)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2；及び(c)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3を含んでなる請求項1-14の何れか一項に記載の抗体。

10

【請求項19】

配列番号：9、10、11及び/又は12の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列を更に含んでなる請求項1-18の何れか一項に記載の抗体。

【請求項20】

配列番号：13、14、15及び/又は16の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を更に含んでなる請求項1-19の何れか一項に記載の抗体。

20

【請求項21】

(a)配列番号：7のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列；(b)配列番号：8のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列；又は(c)(a)のVH配列及び(b)のVL配列を含んでなる請求項1-20の何れか一項に記載の抗体。

【請求項22】

配列番号：7のVH配列を含んでなる請求項21に記載の抗体。

【請求項23】

配列番号：8のVVL配列を含んでなる請求項21に記載の抗体。

【請求項24】

配列番号：7のVH配列及び配列番号：8のVL配列を含んでなる抗体。

【請求項25】

完全長IgG1抗体である請求項1-24の何れか一項に記載の抗体。

30

【請求項26】

請求項1-24の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項27】

請求項26に記載の核酸を含んでなる宿主細胞。

【請求項28】

抗体が生産されるように請求項27に記載の宿主細胞を培養することを含んでなる抗体の生産方法。

【請求項29】

宿主細胞から抗体を回収することを更に含んでなる請求項28に記載の方法。

【請求項30】

請求項1-24の何れか一項に記載の抗体及び細胞傷害性剤を含んでなるイムノコンジュゲート。

40

【請求項31】

請求項1-24の何れか一項に記載の抗体及び薬学的に許容可能な担体を含んでなる薬学的製剤。

【請求項32】

更なる治療剤をさらに含んでなる請求項16に記載の薬学的製剤。

【請求項33】

医薬としての使用のための請求項1-24の何れか一項に記載の抗体。

【請求項34】

50

癌の治療における使用のための請求項 1 - 2 4 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 3 5】

細胞増殖の阻害における使用のための請求項 1 - 2 4 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 3 6】

医薬の製造における請求項 1 - 2 4 の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 3 7】

医薬が癌の治療のためである請求項 3 6 に記載の使用。

【請求項 3 8】

医薬が細胞増殖の阻害のためである請求項 3 6 に記載の使用。

【請求項 3 9】

癌を有する個体を治療する方法において、個体に有効量の請求項 1 - 2 4 の何れか一項に記載の抗体を投与することを含んでなる方法。

【請求項 4 0】

個体に更なる治療剤を投与することを更に含んでなる請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

個体における細胞増殖を阻害する方法において、細胞増殖を阻害するために個体に有効量の請求項 1 - 2 4 の何れか一項に記載の抗体を投与することを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

この出願は、2011年4月7日に出願された米国特許出願番号 61/473,106 の優先権を主張するものであり、その内容を出典明記によってここに援用する。

(配列表)

本出願は E F S - W e b を通して A S C I I フォーマットにおいて提出されている配列表を含み、その全体を出典明記によってここに援用する。2012年3月22日に作成された前記 A S C I I コピーは、名称 P4524R1WO.txt であり、サイズは 37,020 である。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は抗 F G F R 4 抗体、及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

線維芽細胞増殖因子 (F G F) は多様な生物学的活性を伴うポリペプチドに構造的に関連する 22 のファミリーを含む；これらのシグナル伝達分子の多くはそれらの同族の受容体 (F G F R ; F G F R 1-4 と命名される)、受容体チロシンキナーゼのファミリーに結合し活性化させることによって機能する。これらの受容体-リガンド相互作用は、受容体二量体化及び自己リン酸化、膜結合型及び細胞質アクセサリータンパク質との複合体の形成、及び複数のシグナル伝達カスケードの開始をもたらす。F G F R - F G F シグナル伝達系は、細胞機能 / プロセス、例えば増殖、分化、遊走、形態形成、及び血管新生を制御することにより、発生及び組織修復において重要な役割を果たす。

【0 0 0 4】

F G F R における変更 (すなわち過剰発現、変異、トランスロケーション、及びトランケーション) は、骨髄腫、乳房、胃、結腸、膀胱、膵臓、及び肝細胞癌を含む多くのヒト癌に伴われる。肝細胞癌 (H C C) は、癌に関連した死亡の主要な世界的原因の一つであり、年あたり 50 万を超す死者をだす。癌における F G F R 4 の役割は十分に解明されないままであり、幾つかの発見はこの受容体が H C C 発生及び / 又は進行において重要な役割を果たしうることを示唆する。F G F R 4 はヒト肝細胞に存在する主な F G F R アイソフォームである；我々はまた肝臓組織が最も高い転写レベルの F G F R 4 を有することを既に報告した (Lin et al., 2007)。肝癌 (並びに幾つかのタイプのヒト腫瘍) において過剰

10

20

30

40

50

に発現されている F G F R 4 に加えて、幾つかのミスセンス遺伝子変化が H C C 患者サンプルにおいて観察されている；特に、F G F R 4 における高頻度の G 3 8 8 R 一塩基多型(頭頸部癌では低減された生存率、並びに結腸、軟部組織、前立腺、及び乳癌では悪性表現型を伴う)が同定された。更に、マウスにおける F G F 1 9 (すなわち F G F R 4 - 特異的リガンド)の異所性発現が肝細胞増殖、肝細胞異形成、及び新生物形成を促進することが既に実証されている。

【 0 0 0 5 】

治療剤として開発に最適である臨床特性を有する薬剤に対するニーズがいまだあることが明らかである。ここに記載の発明はこのニーズを満たし、また他の利点を提供する。ここに引用される全ての参考文献は、特許出願及び刊行物を含め、その全体が出典明記により援用される。

10

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

発明は抗 F G F R 4 抗体及びその使用方法を提供する。

【 0 0 0 7 】

一態様では、発明は、F G F R 4 に結合する単離された抗体であって、1 n M の親和性でヒト F G F R 4 に結合する抗 F G F R 4 抗体を提供する。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は 1 n M の親和性でヒト、マウス及びカニクイザル F G F R 4 に結合する。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は 0.05 n M の親和性でヒト F G F R 4 に結合する。

20

【 0 0 0 8 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は図 1 2 D に示すアミノ酸配列を有するマウス C 3 タンパク質に実質的に結合しない。

【 0 0 0 9 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は変性 F G F R 4 に結合する。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は変性、還元 F G F R 4 に結合する。幾つかの実施態様では、F G F R 4 に対する抗 F G F R 4 抗体の結合はウエスタンプロットを使用して検出される。

【 0 0 1 0 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は G 1 6 5 A 変異を含んでなるヒト F G F R 4 に有意に結合しない。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はアミノ酸番号 1 5 0 ~ 1 7 0 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなるか、から基本的に成るか又はから成る配列と少なくとも 70%、80%、90%、95%、98% の配列同一性又は類似性を有するポリペプチドに結合する。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はアミノ酸番号 1 5 0 ~ 1 7 0 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなるか、から基本的になるか又はからなるポリペプチドに結合する。

30

【 0 0 1 1 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 は F G F R 4 活性のアンタゴニストである。幾つかの実施態様では、F G F R 4 活性は F G F 誘導細胞増殖、F G F R 4 への F G F 結合、F G F 1 9 に曝露された細胞における C Y P 7 7 発現の G F 1 9 - 媒介阻害、又は F G F 1 9 - 誘導コロニー形成である。幾つかの実施態様では、F G F R 4 に対する F G F 1 及び / 又は F G F 1 9 結合が阻害される。幾つかの実施態様では、F G F R 4 に対する F G F 1 結合の阻害の I C 5 0 は約 0.10 n M であり、F G F R 4 に対する F G F 1 9 結合の阻害の I C 5 0 は約 0.10 n M である。

40

【 0 0 1 2 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体モノクローナル抗体である。

【 0 0 1 3 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はヒト、ヒト化、キメラ抗体である。

【 0 0 1 4 】

幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は F G F R 4 に結合する抗体断片である。

50

【0015】

幾つかの実施態様では、抗体は(a)配列番号：3のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H3、(b)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3、及び(c)配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H2を含む。

【0016】

幾つかの実施態様では、抗体は(a)配列番号：1のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H1、(b)配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H2、及び(c)配列番号：3のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H3を含む。幾つかの実施態様では、抗体は(a)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1、(b)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2、及び(c)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3を更に含む。10

【0017】

幾つかの実施態様では、抗体は(a)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1、(b)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2、及び(c)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3を含む。幾つかの実施態様では、抗体は配列番号：9、10、11及び/又は12の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列を更に含む。20

【0018】

幾つかの実施態様では、抗体は配列番号：13、14、15及び/又は16の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を更に含む。

【0019】

幾つかの実施態様では、抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列；(b)配列番号：8のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列；又は(c)(a)のVH配列及び(b)のVL配列を含む。幾つかの実施態様では、抗体は配列番号：7のVH配列を含む。幾つかの実施態様では、抗体は配列番号：8のVL配列を含む。

【0020】

幾つかの実施態様では、抗体は配列番号：7のVH配列及び配列番号：8のVL配列を含む。

【0021】

幾つかの実施態様では、抗体は完全長IgG1抗体である。30

【0022】

発明はまた、ここに記載の何れかの抗体をコードする単離された核酸を提供する。

【0023】

発明はまた、ここに記載の何れかの核酸を含んでなる宿主細胞を提供する。

【0024】

発明はまた、抗体が生産されるようにここに記載の宿主細胞を培養することを含んでなる抗体の生産方法を提供する。幾つかの実施態様では、方法は宿主細胞から抗体を回収することを更に含む。

【0025】

発明はまた、ここに記載の何れかの抗体及び細胞傷害剤を含んでなるイムノコンジュゲートを提供する。40

【0026】

発明はまた、ここに記載の何れかの抗体及び薬学的に許容可能な担体を含んでなる薬学的製剤を提供する。幾つかの実施態様では、薬学的製剤は更なる治療剤を更に含む。

【0027】

発明はまた、医薬としての使用のためのここに記載の何れかの抗体を提供する。

【0028】

幾つかの実施態様では、抗体は癌の治療における使用のためである。

【0029】

10

20

30

40

50

幾つかの実施態様では、抗体は細胞増殖の阻害における使用のためである。

【0030】

幾つかの実施態様では、抗体は医薬の製造における使用のためである。

【0031】

幾つかの実施態様では、医薬は癌の治療のためである。

【0032】

幾つかの実施態様では、医薬は細胞増殖の阻害のためである。

【0033】

発明はまた、癌を有する個体を治療する方法において、個体に有効量のここに記載の何れかの抗体を投与することを含んでなる方法を提供する。幾つかの実施態様では、方法は個体に更なる治療剤を投与することを更に含む。

10

【0034】

発明はまた、個体における細胞増殖を阻害する方法において、細胞増殖を阻害するために個体に有効量のここに記載の何れかの抗体を投与することを含んでなる方法を提供する。

10

【0035】

幾つかの実施多様では、癌は、乳房、肺、脾臓、脳、腎臓、卵巣、胃、白血病、子宮内膜、結腸、前立腺、下垂体、乳房線維腺腫、頭頸部、軟部組織、神経芽細胞腫、メラノーマ、子宮内膜、精巣、胆管細胞癌、胆嚢及び/又は肝臓の癌である。

【0036】

ある実施態様はでは、癌は F G F R 4 発現(例えは過剰発現)、増幅、又は活性化を呈する。ある実施態様はでは、癌は F G F R 4 増幅を呈する。

20

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】 F G F R 4 は F G F 1 9 - 媒介肝腫瘍形成に必要である。A、年齢 10 ヶ月の F G F 1 9 - T G : F G F R 4 - W T マウスの肝臓表面から突出する複数の大きい隆起腫瘍(矢印)(左パネル)。年齢 10 ヶ月の F G F 1 9 - T G : F G F R 4 - K O マウスからの肝臓(右パネル)。B、F G F R 4 - K O 又は F G F R 4 - W T マウスで交配された雌(左パネル)及び雄(右パネル) F G F 1 9 - T G 又は野生型マウスにおける B r d U 取り込み。C、D E N で処置された年齢 4 ヶ月の F G F 1 9 - T G : F G F R 4 - W T マウスの肝臓の表面上の複数の大きい隆起腫瘍(矢印)。D、肉眼及び組織学的検査で決定される D E N で処置された雄及び雌 F G F 1 9 - T G マウスにおける肝腫瘍の有病率。E、D E N で処置された F G F 1 9 - T G 又は野生型雌(左パネル)及び雄(右パネル)マウスからの肝重量。アステリスク(*)は、肝臓の重量は D E N で処置された雄 F G F 1 9 - T G マウスについては 7 ヶ月の時点から測定不可能であることを示し、なぜなら 6 ヶ月の年齢を超すと何れも生存しなかったからである。F、D E N で処置された F G F 1 9 - T G 又は野生型雌(左パネル)及び雄(右パネル) F G F R 4 - K O マウスの肝重量。

30

【図2】 F G F R 4 への L D 1 結合。A、L D 1 はヒト(h)、マウス(m)、及びカニクイザル(c) F G F R 4 に結合するが、h F G F R 1、h F G F R 2、又は h F G F R 3 に結合しない。固定化 F G F R - F c キメラタンパク質への L D 1 の結合を固相結合アッセイで決定した。B、表面プラズモン共鳴で決定されるマウスカニクイザル、及びヒト F G F R 4 への L D 1 結合の親和性。C、F A C S で測定される安定してトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞の細胞表面に発現された h F G F R 4 への L D 1 の結合(R F U = 相対蛍光単位)。D、固相結合アッセイで決定される点変異を持つ固定化 h F G F R 4 - F 1 a g キメラタンパク質への L D 1 の結合。E、ウエスタンプロットで決定される点変異を持つ h F G F R 4 - F 1 a g キメラタンパク質への L D 1 の結合。変異タンパク質を電気泳動し、L D 1、抗 F G F R 4 (8 G 1 1)、及び抗 F 1 a g 抗体を使用して逐次的に免疫プロットした。F、F G F 1 9 (灰色)に結合した F G F R 4 (黒及び白)上の G 1 6 5 (黒)の位置を示す二量体モデル。

40

【図3】 L D 1 は F G F R 4 活性を阻害する。A、L D 1 は F G F 1 及び F G F 1 9 への

50

F G F R 4 結合を阻害し、固相結合アッセイで決定される。B、L D 1 は F G F R 4 / R 1 を安定に発現する B a F 3 細胞の F G F 1 - 刺激増殖を阻害する。C、L D 1 は F G F R 4 を安定に発現する L 6 細胞における F G F R 4 シグナル伝達を阻害する。D、L D 1 を使用した F A C S 分析で決定される肝腫瘍細胞株のサブセットにおける F G F R 4 タンパク質の細胞表面発現。

【図 4】L D 1 は肝癌細胞株における F G F R 4 生物学的活性を阻害する。A、L D 1 は H E P 3 B 細胞における F G F R 4 シグナル伝達を阻害し、ウエスタンプロットで評価される。B、L D 1 は H E P 3 B 細胞における F G F R 4 - 制御化 C Y P 7 1 発現を阻害する。C Y P 7 1 レベルは未処置細胞におけるレベルに対する倍発現として表される。C、L D 1 は肝癌細胞株のパネルにおいて F G F R 4 - 制御化 c - F o s 発現を阻害する。結果は未処置細胞における c - F o s レベルに対する倍発現として表される。D、F G F R 4 s h R N A ドキシサイクリン - 誘導ベクターで安定にトランスフェクトされた J H H 5 細胞における F G F R 4 発現の抑制によるコロニー形成の阻害。E、L D 1 は H C C 細胞株コロニー形成を阻害する。F、L D 1 - 阻害化肝癌細胞株コロニー形成の数え上げ。値は添加 L D 1 の非存在において数え上げられたコロニーの数のパーセントとして表される。

【図 5】L D 1 のインビボ効果。A、L D 1 はマウス肝臓における F G F 1 9 - 制御化 c - F o s 発現を阻害する。結果は非処置マウスの肝臓における c - F o s レベルに対する倍発現として表される。B、L D 1 (3 0 m g / k g ; 週に 2 回) はインビボで H U H 7 異種移植腫瘍増殖を阻害する。C、図 5 B からの H U H - 7 異種移植腫瘍における F G F R 4 、 C Y P 7 1 、 c - F o s 、及び e g r - 1 の m R N A 発現における L D 1 の効果。D、コントロール抗体で処置された D E N - 促進化 F G F 1 9 - T G : F G F R 4 - W T マウスの肝臓表面から突出した複数の大きい隆起腫瘍(矢印)(上パネル)。L D 1 で処置された D E N - 促進化 F G F 1 9 - T G : F G F R 4 - W T マウスの肝臓(下パネル)。E、コントロール抗体、L D 1 、又は 1 A 6 (抗 F G F 1 9 抗体) で処置された D E N - 促進化 F G F 1 9 - T G : F G F R 4 - W T マウスの肝重量。

【図 6】F G F R 4 発現は癌において調節解除される。A、箱ひげプロットは B i o E x p r e s s データベースの m R N A 分析で決定されるヒト腫瘍及び正常組織における F G F R 4 発現を示す。中心線は中央値を示す；箱は第一及び第三四分位間の四分位範囲を表す。「ひげ」は四分位間から極値の位置まで延在する。B、乳房(X 1 0 0 拡大率)及び膵臓(X 1 0 0 拡大率)腺癌、及び肝細胞癌(X 2 0 0 拡大率及び X 4 0 0 拡大率)のサンプルにおける F G F R 4 免疫染色。C、q R T - P C R で決定されるヒト正常肝及び肝腫瘍のパネルにおける F G F R 4 m R N A 発現。各サンプルの値をサンプル N 1 において観察されるレベルに対する倍発現として表す。

【図 7】肝癌細胞株における F G F R の発現。A、q R T - P C R で決定される肝腫瘍細胞株のパネルにおける F G F R 4 m R N A 発現。値は J H H 4 細胞株における F G F R 1 レベルに対する倍発現として表される。B、ウエスタンプロットで決定される図 S 1 A における同じパネルの細胞株における F G F R 4 タンパク質発現。

【図 8】L D 1 は H U H 7 細胞における F G F R 4 生物学的活性を阻害する。L D 1 は H U H 7 細胞における F G F R 4 - 制御化 C Y P 7 1 発現を阻害する。C Y P 7 1 レベルは未処置細胞におけるレベルに対する倍発現として表される。

【図 9】L D 1 のインビボ効果。L D 1 (3 0 m g / k g) はインビボでの H U H 7 異種移植腫瘍増殖を阻害する。L D 1 の抗腫瘍効果を隔週モダリティにおいて評価した。

【図 10】抗 F G F R 4 のマウス及びヒト化変異体の可変ドメイン配列。マウス L D 1 及びヒト化変異体 h L D 1 のアミノ酸配列。v B 及び h L D 1 . v 2 2 をトラスツズマブにおいて使用される(A)ヒトカッパ I (h u K I) 及び(B)ヒト V H サブグループ I I I (h u I I I) 可変ドメインフレームワークとアラインする。差異をドットボックスにおいてハイライトし、位置を K a b a t に従って番号付けする。マウス L D 1 からヒト可変カッパ I 及びサブグループ I I I コンセンサスフレームワークに移植された超可変領域を配列、構造及び接触 C D R 定義の組合せに基づいて選択し(MacCallum RM et al.. J of Molec

10

20

30

40

50

Biol (1996); 262:732-45)、ボックスで囲む。軽鎖における3つの副尺位置を変更し、ヒト化の間親和性を回復した；これらの位置が曝露される表面であると予測された。

【図11】抗FGFR4抗体変異体の薬物動態及び分布。(A)FGFR4-ELISAを使用したFGFR4へのchLD1及びhLD1.vBの結合の比較。(B)CRLnu/nuマウスにおけるHUH7ヒト肝細胞癌異種移植モデルにおけるchLD1、hLD1.vB及びビヒクルの16日目の腫瘍体積の比較。抗体を週に2回30mg/kgで投与した(10マウス/グループ)。chLD1のみがPBSコントロールと比較して腫瘍増殖の低減に有効であり(p値=0.014)、hLD1.vBは有意には有効ではなかった(p値=0.486)。(C)chLD1及びhLD1.vB NCRnuudeマウスの薬物動態を1又は20mg/kgIVで投与し、サンプルをFGFR4-ELISAを使用して分析した。類似な結果がIgG-ELISAを使用して得られた(示さず)。(D)NCRnuudeマウスにおける¹²⁵I-chLD1及び¹²⁵I-hLD1.vBの組織分布。マウスに¹²⁵I-chLD1又は¹²⁵I-hLD1.vBを投与し、組織の投与量/グラムのパーセント(%ID/g)を方法に記載のように投与の2時間後に決定した。

【図12】hLD1.vB及びマウスC3d間の相互作用の同定。(A)PBS/BSA又はNCRnuudeマウス、ラット、ヒト及びカニクイザル血漿における48時間のインキュベーション後のchLD1(斜線バー)及びhLD1.vB(白色バー)の検出。パーセント回収をFGFR4-ELISAを使用して決定した。(B)¹²⁵I-chLD1(中実線)及び¹²⁵I-hLD1.vB(点線)の血漿結合分析。トレースはオフセットである；ドットは150kDaピークの位置を示す。抗体を0及び48時間マウス血漿においてインキュベートし、その後サイズ排除HPLCを使用して分析した。PBS/BSAにおけるインキュベーションでは、ヒト血漿又はカニクイザル血漿であり、図15を参照のこと。全インキュベーションはIgGに対応する予測された150kDaでピークを生じた。高分子量ピークはhLD1.vBを含有するマウス血漿サンプルにおいてのみ観察された。最初の時間点はおよそ270及びおよそ550kDaで更なるピークを示したが、48時間では270kDaピークのみが観察された。高分子量ピークはhLD1.vB/マウス血漿インキュベーションがpH4で実施された場合には観察されず、これらの高分子量ピークの存在がpH依存であることを示す(図15)。(C)マウス血漿の免疫沈降。chLD1及びhLD1.vBを37°Cで24時間マウス血漿においてインキュベートし、サイズ排除HPLCで分析した。次いでプロテインGビーズを画分に加え、その後SDS-PAGE分析をした。およそ37kDaでのバンドがhLD1.vB/マウス血漿サンプル(レーン3)に存在する270kDaピークに対応する画分において検出されたが、カニクイザル又はヒト血漿又はPBS/BSAからのサンプルでは検出されなかった(図15)。このバンドはマウス血漿のみ(レーン4)又はchLD1でインキュベートされたマウス血漿(レーン2)において観察されなかった。タンパク質分子量マーカーをレーン1において実行した。(D)hLD1.vBでの免疫沈降から得られたマウスC3のMS/MS配列包括度。マウスC3の配列を示し(配列番号:38)、C3dをコードする領域に下線をひく。同定されたペプチドは以下の通りである: D V P A A D L S D Q V P D T D S E T R I I L Q G S P V V Q M A E D A V D G E R (配列番号:17) R Q E A L E L I K K G Y T Q Q L A F K (配列番号:18) A A F N N R P P S T W L T A Y V V K (配列番号:19) A A N L I A I D S H V L C G A V K (配列番号:20) Q K P D G V F Q E D G P V I H Q E M I G G F R (配列番号:21) E A D V S L T A F V L I A L Q E A R D I C E G Q V N S L P G S I N K A G E Y I E A S Y M N L Q R P Y T V A I A G Y A L A L M N K (配列番号:22) W E E P D Q Q L Y N V E A T S Y (配列番号:23) Y Y G G G Y G S T Q A T F M V F Q A L A Q Y Q T D V P D H K (配列番号:24) G T L S V V A V Y H A K (配列番号:25) D L E L L A S G V D R (配列番号:26) N T L I I Y L E K (配列番号:27)。

【図13】C3d結合を欠く親和性成熟抗FGFR4変異体。(A)FGFR4-ELISAを使用した評価より前にNCRnuude、C3野生型(wt)及びC3koマウス血清において16時間インキュベートされたchLD1、hLD1.vB及びhLD1.v22の

10

20

30

40

50

F G F R 4 結合の検出。サンプルを P B S / 0 . 5 % B S A においてインキュベートされた同一のサンプルに対して正規化した。(B) h L D 1 . v 2 2 によるマウス C 3 d 免疫沈降の欠如。c h L D 1 (レーン 2)、h L D 1 . v B (レーン 3)及びh L D 1 . v 2 2 (レーン 4)を使用したN C R n u d e マウス血漿からの免疫沈降を S D S - P A G E で分析した。3 7 k D a でのバンドはh L D 1 . v B / マウス血漿サンプルにおいてのみ検出された。タンパク質分子量マーカーをレーン 1 において実行した。

【図 1 4】C 3 d 結合の欠如は薬物動態及び効果を回復させる。(A) C 3 w t 及び C 3 k o マウスにおけるc h L D 1 及びh L D 1 . v B の薬物動態分析。抗体を 2 0 m g / k g で静脈内に投与した；血液におけるそれらの濃度を F G F R 4 E L I S A を使用してモニタした。C 3 k マウスにおけるh L D 1 . v B のクリアランスは C 3 k o 及び C 3 w t マウス双方におけるc h L D 1 のものと類似する。(B) N C R n u d e マウスにおけるc h L D 1 h L D 1 . v B 及びh L D 1 . v 2 2 の薬物動態分析。抗体を 2 0 m g / k g で静脈内に投与した；血液におけるそれらの濃度を F G F R 4 E L I S A を使用してモニタした。h L D 1 . v 2 2 のクリアランスはc h L D 1 のものに類似する。(C) C R L n u / n u マウスにおけるH U H 7 ヒトH C C 異種移植モデルにおけるc h L D 1 h L D 1 . v B 及びh L D 1 . v 2 2 の比較。抗体を毎週 3 0 m g / k g で投与し(1 0 マウス/グループ)、腫瘍体積を 4 週間モニタした。2 1 日目にc h L D 1 及びh L D 1 . v 2 2 (それぞれ p 値 = 7 × 1 0 - 7 及び 3 × 1 0 - 5)は P B S コントロール(中空四角)と比較して腫瘍増殖の低減に効果的であったが、h L D 1 . v B はわずかのみ効果的だった(p 値 = 0 . 0 1 1)。

【図 1 5】インビトロ(A - B)及びインビオ試験(C)サンプルからの血漿における放射標識c h L D 1 及びh L D 1 . v B のサイズ排除 H P L C 分析。^{1 2 5} I - h L D 1 . v B (A)及び^{1 2 5} I - c h L D 1 (B)を P B S / B S A 又はマウス、ヒト及びカニクイザル血漿に加え、0 又は 4 8 時間にサイズ排除 H P L C で分析した。全トレースは I g G の予測された 1 5 0 k D a (右のピーク)でピークを呈した。およそ 2 7 0 (真ん中のピーク)及びおよそ 5 5 0 k D a (左のピーク)での高分子量ピークがh L D 1 . v B を含有する最初のマウス血漿サンプルにおいてのみ観察された；4 8 時間では更なる 2 7 0 k D a ピークのみが観察された。これらの高分子量ピークはp H 4 . 0 のマウス血漿においてh L D 1 . v B で観察され、高分子量ピークの生成がp H 依存であることを示す。高分子量ピークはカニクイザル又はヒト血漿又はc h L D 1 が加えられたいかなる血漿において観察されなかった；(C)インビオマウス血漿サンプル。マウスに、c h L D 1 については 1 2 . 5 2 μ C i / μ g 及びh L D 1 . v B については 9 . 9 9 μ C i / u g の比活性を有する~ 0 . 1 m g / k g の抗体を投与した。血清サンプルを 0 . 2 5 、 2 、 5 、 2 4 、 7 2 及び 1 2 0 時間で収集した。全トレースは I g G の予測された 1 5 0 k D a (右のピーク)でピークを呈した。~ 2 7 0 (真ん中のピーク)及び~ 5 5 0 k D a (左のピーク)での高分子量ピークはh L D 1 . v B 血清サンプルにおいてのみ観察された。高分子量ピークはc h L D 1 では観察されなかった。

【図 1 6】免疫沈降及び S D S - P A G E 分析。抗体を 3 7 ° C で 2 4 時間血漿においてインキュベートし、次いでサイズ排除 H P L C で分画化した。プロテイン G ビーズを高分子量ピークを有するサイズ排除 H P L C 分画に加えた。ブルダウンサンプルを S D S - P A G E で分析した。(A)インビトロラット血漿；(B)インビトロカニクイザル血漿；(C)インビトロヒト血漿。~ 3 7 k D a のタンパク質がh L D 1 . v B でインキュベートされたラットサンプルにおいて検出されたが、カニクイザル及びヒトサンプルでは検出されなかった(それらのそれぞれのゲルのレーン 4)。いかなるプランク血漿(各ゲルのレーン 2)又はc h L D 1 サンプル(各ゲルのレーン 3)においても~ 3 7 k D a タンパク質ではバンドは観察されなかった。タンパク質分子量マーカーをレーン 1 において実行した。(D)インビオマウス血漿。マウスに「方法」に記載のようにh L D 1 . v B 又はc h L D 1 を投与した。次いでプロテイン - G ビーズを 2 時間の投与後時点から収集された血清サンプルに加え、 S D S - P A G E で分析した。~ 3 7 k D a でのバンドはh L D 1 . v B (レーン 3)において検出されたが、c h L D 1 血清サンプル(レーン 2)では検出されなかった

10

20

30

40

50

。タンパク質分子量マーカーをレーン1において実行した。

【図17】C3wt血清、C3koマウス血清、及びPBS/BSAに加えられたchLD1及びhLD1.vBのELISA検出。抗体を血清又はPBS/BSAにおいて一晩インキュベートし、次いでELISAで分析した。PBS/BSAと比較して、hLD1.vBはC3koマウス血清において十分に回収されたが、C3wtマウス血清では回収されなかった。chLD1は全マトリックスから十分に回収された。

【図18】GenBank Accession No. AAB25788の例示的なヒトFGFR4アミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

(発明の実施態様の詳細な説明)

I.(定義)

ここでの目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、下に定義するようにヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むか、又はアミノ酸配列変化を含んでいてもよい。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下又は2以下である。幾つかの実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0039】

「親和性」は、分子(例えば抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有相互作用の合計の強度を意味する。特に示さない限り、ここで使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体と抗原)間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を意味する。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(Kd)により表すことができる。親和性は、ここに開示されたものを含む、当該分野で知られている一般的な方法により測定することができる。結合親和性を測定するための、特定の例証及び例示的実施態様を以下に記載する。

【0040】

「親和性成熟」抗体は、一又は複数の超可変領域(HVR)における一又は複数の変化を有する抗体であって、このような変化を持たない親抗体と比較され、このような変化は抗原に対する抗体の親和性における改善をもたらす。

【0041】

抗血管新生剤は血管の発生をある程度、阻止又は干渉する化合物を指す。抗血管新生剤は、例えば血管新生の促進に関与する増殖因子又は増殖因子受容体に結合する小分子又は抗体でありうる。一実施態様では、抗血管新生剤は血管内皮増殖因子(VEGF)、例えばベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))に結合する抗体である。

【0042】

「抗FGFR4抗体」及び「FGFR4に結合する抗体」なる用語は、抗体がFGFR4を標的にする診断及び/又は治療剤として有用であるような、十分な親和性でFGFR4に結合できる抗体を指す。一実施態様では、無関係な非FGFR4タンパク質への抗FGFR4抗体の結合の程度は、FGFR4への抗体の結合の約10%未満であり、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)で測定される。ある実施態様では、FGFR4に結合する抗体は、1μM、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM(例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M~ 10^{-13} M、例えば 10^{-9} M~ 10^{-13} M)の解離定数(Kd)を有する。ある実施態様では、抗FGFR4抗体は異なる種からのFGFR4間で保存されているFGFR4のエピトープに結合する。

10

20

30

40

50

【0043】

「抗体」なる用語はここでは、最も広い意味において使用され、様々な抗体構造を包含し、限定するものではないがモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び所望の抗原結合活性を呈する限り抗体断片を含む。

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例は、限定するものではないがFv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; ダイアボディ; 線状抗体; 単鎖抗体分子(例えばscFv); 及び抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。

【0044】

参考抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、参考抗体のその抗原への結合を競合アッセイにおいて50%以上阻止する抗体を指し、逆に、参考抗体は抗体のその抗原への結合を競合アッセイにおいて50%以上阻止する。例示的な競合アッセイがここに提供されている。

10

【0045】

「FGFR4」なる用語は、ここで使用される場合、別段に記載される場合を除き、靈長類(例えばヒト)及びげっ歯類(例えばマウス及びラット)などの哺乳類を含む何れかの脊椎動物供給源からの何れかの天然FGFR4を指す。用語は「完全長」、非プロセシングFGFR4並びに細胞におけるプロセシングから生じるFGFR4の何れかの形態を包含する。用語はまたFGFR4の天然に生じる変異体、例えばスプライスバリエント又は対立遺伝子多型を包含する。例示的なヒトFGFR4のアミノ酸配列を図18に示す。

20

【0046】

「FGFR4活性化」は、FGFR4受容体の活性化、又はリン酸化を指す。一般的に、FGFR4活性化はシグナル伝達(例えばFGFR4又は基質ポリペプチドにおけるチロシン残基をリン酸化するFGFR4受容体の細胞内キナーゼドメインによって引き起こされる)をもたらす。FGFR4活性化は興味のFGFR4受容体へのFGFR4リガンド(Gas6)結合によって媒介されうる。FGFR4へのGas6結合はFGFR4のキナーゼドメインを活性化し得、これによって、FGFR4におけるチロシン残基のリン酸化及び/又は更なる基質ポリペプチドにおけるチロシン残基のリン酸化がもたらされる。

【0047】

「癌」又は「癌性」なる用語は典型的には無秩序な細胞成長/増殖によって特徴づけられる哺乳類における生理的状態を指すか又は説明する。癌の例は、限定するものではないが、細胞腫、リンパ腫(例えばホジキン及び非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含む。このような癌のより特定の例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝細胞癌、白血病及び他のリンパ増殖性障害、及び様々なタイプの頭頸部癌を含む。

30

【0048】

「細胞増殖性疾患」および「増殖性疾患」なる用語は、ある程度の異常な細胞増殖と関係している疾患を指す。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

40

【0049】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテバ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(商標登録))のようなアルキル化剤; ブスルファン、インプロスルファン及びビポスルファンのようなスルホン酸アルキル類; ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類; アルトレートアミン(alretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethyloolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラミン類; アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン); デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビロール、MARINOL(登録商標)); ラバコン; ラバコール; コ

50

ルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログトポテカン(HYCANTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレチン、及び9-アミノカンプトテシンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフオスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスターなどナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンI及びカリケアマイシンI(例えばNicolaou et al., *Angew. Chem Int'l. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)参照)；CDP323、経口-4インテグリンインヒビター；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ビロリノ-ドキソルビシン、ドキソルビシンHC1リポソーム注射(DOXIL(登録商標))、リポソームドキソルビシンTLC-D-99(MYOCET(登録商標))、ペグ化リポソームドキソルビシン(CAELYX(登録商標))及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトイマイシンCのようなマイトイマイシン、マイコフェノール酸(my cophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(que lamycin)、ロドルビシン(rodoxorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、ゲムシタビン(GEMZAR(登録商標))、テガフル(UFTORAL(登録商標))、カペシタビン(XELODA(登録商標))、エポチロン及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、ブテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fladarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフルール、シタラビン、ジデオキシリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(best rabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(el fornithine)；酢酸エリップチニウム(elliptinium)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonida 10 20 30 40 50

inine) ; メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine) ; ミトグアゾン(mitoguazone) ; ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol) ; ニトラクリン(nitracrine) ; ペントスタチン；フェナメット(phenemate) ; ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquine)；2, 2', 2'''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELDIDESINE(登録商標)、FILEDESIN(登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトプロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytoseine)；アラビノシド('Ara-C')；チオテパ；タキソイド、例えばパクリタキセル(TAXOL(登録商標))、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤(ABRAXANETM)およびドセタキセル(TAXOTERE(登録商標))；クロランブシリル；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；プラチナ薬剤、例えばシスプラチニン、オキサリプラチニン(例えばELOXATIN(登録商標))及びカルボプラチニン；チューブリン重合が微小管を形成するのを妨げるビンカ、例えばビンプラスチニン(VELBAN(登録商標))、ビンクリスチニン(ONCOVIN(登録商標))、ビンデシン(ELDISINE(登録商標))、FILEDESIN(登録商標)およびビノレルビン(NAVELBINE(登録商標))；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトキサントロン；ロイコボリン；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチロールニチニン(DMFO)；レチノイン酸などのレチノイド、例えばベキサロテン(TARGRETIN(登録商標))；ビスホスホネート、例えばクロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロン酸/ゾレドロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロネート(SKELID(登録商標))、又はリセドロネート(ACTONE(登録商標))；トロキサシタビン(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に關係するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、H-Rasおよび上皮増殖因子レセプター(EGFR)；ワクチン、例えばTHERATOP(E(登録商標)ワクチンおよび遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチンおよびVAXID(登録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ1インヒビター(例えばLURTOTECAN(登録商標))；r m RH(例えばABARELIX(登録商標))；BAY439006(ソラフェニブ；Bayer)；SU-11248(スニチニブ、SUTENT(登録商標)、Pfizer)；ペリホシン、COX-2インヒビター(例えばセレコキシブ又はエトリコキシブ)、プロテオゾームインヒビター(例えばPS341)；ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標))；CCI-779；ティピファニブ(R11577)；オラフェニブ(orafenib)、ABT510；BCL-2インヒビター、例えばオブリメルセンナトリウム(GENASENSE(登録商標))；ピクサントロン；EGFRインヒビター(下の定義を参照)；チロシンキナーゼインヒビター(下の定義を参照)；セリン-スレオニンキナーゼインヒビター、例えばラパマイシン(シロリムス、RAPAMUNE(登録商標))；ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、例えばロナファーニブ(SCH6636、SARASARTM)；及び上述したものの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体、並びに、上記のうちの2つ以上の組み合わせ、例えば、CHOP(シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチニン、及びブレドニゾロンの併用療法の略称)、及びFOLFOX(5-FU及びロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチニン(ELOXATINTM)を用いる治療計画の略称)、及び上記何れかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体類；並びに上記の2以上の組合せが含まれる。

10

20

30

40

50

【0050】

ここに定義される化学療法剤は、癌の増殖を促進しうるホルモンの効果を制御、低減、阻止、又は阻害するように作用する「抗ホルモン剤」又は「内分泌治療剤」を含む。それらはホルモン自体であり得、例えば限定するものではないが：混合アゴニスト／アンタゴニストプロファイルを伴う抗エストロゲン、例えばタモキシフェン(NOLVADEX(登録商標))、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン(FARESTON(登録商標))、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン(EVISTA(登録商標))、トリオキシフェン、ケオキシフェン、及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)、例えばSERM3；アゴニスト特性をもたない純抗エストロゲン、例えばフルベストラント(FASLODEX(登録商標))、及びEM800(このような薬剤はエストロゲン受容体(ER)二量体化を阻止、DNA結合を阻害、ERターンオーバーを増加、及び／又はERレベルを抑制しうる)；アロマターゼ阻害剤、例えばステロイド性アロマターゼ阻害剤、例えばホルメスタン及びエキセメスタン(AROMASINR)、及び非ステロイド性アロマターゼ阻害剤、例えばアナストラゾール(ARIMIDELEX)、レトロゾール(FEMARA(登録商標))及びアミノグルテチミド、及び他のアロマターゼ阻害剤、例えばボロゾール(RIVISOR(登録商標))、酢酸メゲストロール(MEGASE(登録商標))、ファドロゾール、及び4(5)-イミダゾール；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えばリュープロリド(LUPRON(登録商標))及びELIGARD(登録商標))、ゴセレリン、ブセレリン、及びトリプテレリン；性ステロイド、例えばプロゲスチン、例えば酢酸メゲストロール及び酢酸メドロキシプロゲステロン、エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロール及びプレマリン、及びアンドロゲン／レチノイド、例えばフルオキシメステロン、全てのトランスレチノイン酸及びフェンレチニド；オナプリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター(ERD)；抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド及びビカルタミド；及び上記の何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体；並びに上記の二つ以上の組合せを含む。

【0051】

「キメラ」抗体なる用語は抗体であって、重及び／又は軽鎖の一部が特定の供給源又は種に由来し、重及び／又は軽鎖の残りが異なる供給源又は種に由来する抗体を指す。

【0052】

抗体の「クラス」は、その重鎖が持つ定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。5つの主要クラスの抗体：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらの内幾つかはサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂に更に分けられ得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、γ、δ、ε、μ及びμと呼ばれる。

【0053】

「細胞分裂阻害剤」なる用語は、インビトロ又はインビボで細胞の増殖を停止させる化合物又は組成物を指す。従って、細胞分裂阻害剤はS期における細胞のパーセンテージを有意に低減されるものであります。細胞分裂阻害剤の更なる例は、G0/G1停止又はM-期停止を誘導することによって細胞周期進行を阻止する薬剤を含む。ヒト化抗HER2抗体トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))はG0/G1停止を誘導する細胞分裂阻害剤の例である。古典的M-期ブロッカーは、ビンカ(ビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキサン、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1を停止させる特定の薬剤はS-期停止にも波及し得、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-Cがある。更なる情報は、Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), e.g., p. 13に見出される。タキサン(パクリタキセル及びドセタキセル)は、双方ともイチイ(yew tree)に由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタ

10

20

30

40

50

キセル(TAXOTERER, Rhone-Poulenc Rorer)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標), Bristol-Myers Squibb)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルはチューブリン二量体から微小管の組立てを促進し、脱重合を防ぐことによって微小管を安定化させ、細胞における有糸分裂の阻害をもたらす。

【0054】

ここで用いられる「細胞傷害剤」なる用語は、細胞の機能を阻害又は抑制し、及び/又は細胞死又は破壊を生じせしめる物質を意味する。細胞傷害剤は、限定するものではないが、放射性同位体(例えば、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 及び ^{166}Lu の放射性同位体)、化学療法剤又は薬物(例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド類(ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシン又は他の挿入剤、増殖阻害剤；酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、並びに下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含む。

10

【0055】

「 FGFR4 発現、増幅、又は活性化を呈する」癌又は生物学的サンプルは、診断テストにおいて、 FGFR4 を発現する(過剰発現を含む)、増幅 FGFR4 遺伝子を有する、及び/又は他に FGFR4 の活性化又はリン酸化を呈するものである。

20

【0056】

「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因するそれらの生物学的活性を指し、抗体アイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例は：C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)；Fc受容体結合；抗体依存性細胞傷害(ADC)；食作用；細胞表面受容体(例えばB細胞受容体)のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化を含む。

【0057】

「有効量」の薬剤、例えば薬学的製剤は、所望の治療的又は予防的結果を達成するために、必要な投与量及び期間での有効な量を指す。

【0058】

ここでは「Fc領域」なる用語は、少なくとも定常領域の一部を有する免疫グロブリン重鎖のC-末端領域を定義するために使用される。用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む。一実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、又はPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで伸展する。しかしながら、Fc領域のC-末端リジン(Lys447)は存在する場合もあればしない場合もある。ここで別段に示さない限り、Fc領域又は定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるEUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

30

【0059】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、及びFR4から一般的に成る。従って、HVR及びFR配列は一般的に次の配列VH(又はVL)：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4において見られる。

40

【0060】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全体抗体」なる用語は、ここでは互換的に使用され、天然抗体構造に実質的に類似した構造を有するか、又はここに定義されるFc領域を有する重鎖を有する抗体を指す。

【0061】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」なる用語は互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、このような細胞の子孫を含む。宿主細胞は「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これは継代の回数に關係なく一次形質転換細胞及

50

びそれに由来する子孫を含む。子孫は核酸内容において親細胞と完全に同一でなくともよく、変異を含みうる。最初に形質転換された細胞についてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する変異体子孫がここに含まれる。

【0062】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞から生産されるか又はヒト抗体レパートリー又は他のヒト抗体-コード配列を利用する非ヒト供給源から得られる抗体のものに対応するアミノ酸配列を持つものである。ヒト抗体のこの定義は非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を特異的に除外する。

【0063】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV L又はV Hフレームワーク配列の選別において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV L又はV H配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。一般に、配列のサブグループはKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3におけるようなサブグループである。一実施態様では、V Lについて、サブグループはKabat等におけるようなサブグループ Iである。一実施態様では、V Hについて、サブグループは上掲のKabat等におけるようなサブグループ I I Iである。

【0064】

「ヒト化」抗体は、非ヒトH V Rからのアミノ酸残基及びヒト F Rからのアミノ酸残基を含んでなるキメラ抗体を指す。ある実施態様では、ヒト化抗体は実質的には全ての少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインを含み、全て又は実質的には全てのH V R (例えばCDR)は非ヒト抗体のものに態様し、全て又は又は実質的には全てのF Rはヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は場合によっては、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含みうる。抗体の「ヒト化形態」、例えば非ヒト抗体は、ヒト化を経た抗体を指す。

【0065】

「超可変領域」又は「H V R」なる用語は、ここで使用される場合、配列において超可変であるか及び/又は構造的に定義されたループ(「超可変ループ」)を形成する抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般的に、天然の4鎖抗体は6つのH V R; 3つはV H (H 1, H 2, H 3)であり、3つはV L (L 1, L 2, L 3)を含む。H V Rは一般的に超可変ループから及び/又は「相補性決定領域」(CDR)からのアミノ酸残基を含み、後者は最も高い配列可変性のものであるか及び/又は抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26-32(L 1)、50-52(L 2)、91-96(L 3)、26-32(H 1)、53-55(H 2)、及び96-101(H 3)で生じる。(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。例示的なCDR(CDR-L 1、CDR-L 2、CDR-L 3、CDR-H 1、CDR-H 2、及びCDR-H 3)はアミノ酸残基L 1の24-34、L 2の50-56、L 3の89-97、H 1の31-35B、H 2の50-65、及びH 3の95-102で生じる。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。V HにおけるCDR 1を除き、CDRは一般的に超可変ループからのアミノ酸残基を含む。CDRはまた「特異性決定領域」又は「SDR」を含み、これは抗原に接触する残基である。SDRはabbreviated-CDR、又はa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含まれる。例示的なa-CDR(a-CDR-L 1、a-CDR-L 2、a-CDR-L 3、a-CDR-H 1、a-CDR-H 2、及びa-CDR-H 3)はアミノ酸残基31-34(L 1)、50-55(L 2)、89-96(L 3)、31-35B(H 1)、50-58(H 2)、及び95-102(H 3)で生じる。(Almagro and Franssen, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照)。別段の記載がある場合を除き、H V R残基及び可変ドメインにおける他の残基(例えばF R残基)はここでは上掲のKabat et al.に従って番号付けされる。

【0066】

10

20

30

40

50

「イムノコンジュゲート」は、限定するものではないが細胞傷害剤を含む一又は複数の異種性分子にコンジュゲートされた抗体である。

【0067】

「個体」又は「被験体」は哺乳類である。哺乳類は、限定するものではないが、家畜動物(例えはウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ)、靈長類(例えはヒト及び非ヒト靈長類、例えはサル)、ウサギ、及びげっ歯類(例えはマウス及びラット)を含む。ある実施態様では、個体又は被験体はヒトである。

【0068】

「細胞成長又は増殖を阻害する」とは、細胞の成長又は増殖を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%低下させることを意味し、細胞死の誘導を含む。

10

【0069】

「単離された」抗体は、その自然環境の構成要素から切り離されたものである。幾つかの実施態様では、例えは、抗体は95%を超えるまたは99%まで純度を純化される。そして、電気泳動的である(例えはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動法)かまたはクロマトグラフィである(例えはイオン交換または逆位相HPLC)。抗体純度の評価のための方法の再調査のために、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

20

【0070】

「単離された」核酸は、その自然環境の構成要素から切り離された核酸分子に関連する。単離された核酸は通常核酸分子を含む細胞に含まれる核酸分子を含む、しかし、核酸分子は外部染色体的にまたはその自然染色体場所と異なる染色体場所である。

20

【0071】

「抗FGFR4抗体をコード化している単離された核酸」は抗体重鎖および軽鎖(またはその断片)をコード化している一つ以上の核酸分子に関連する。そして、宿主細胞の一つ以上の場所に存在するこの種の核酸分子及び、この種の核酸分子を单一のベクトルまたは別々のベクトルに含む。

30

【0072】

本願明細書において使われるよう、本発明の抗体に関する「全くかほとんど結合しない」なるフレーズは抗体が締め具の生物学上意味がある量を示さないことを意味しない。従来技術において理解されるよう、活性の量は量的にまたは質的に、参照相対物及び本発明の抗体の間の比較ができるくらいたく決定されることがある。活性は測定されることができるかまたは従来技術において公知のいかなる分析もまたはテクニックに従って検出されることができる。そして、例えは、本願明細書において記載されているそれらを含む。その参照相対物及び本発明の抗体のための活性の量は、平行したか別々の実行において決定されることがある。

30

【0073】

「モノクローナル抗体」なる用語は本願明細書において使用する、すなわち、実質的に均一な抗体の人口から得られた抗体に照会する、人口から成る個々の抗体は同一でおよび/または例えは、可能な異型抗体を除いて、同じエピトープを結合する。そして、自然に起こっている突然変異を含むかまたは单クローン抗体準備の製造の間、起こる。そして、この種の異型が一般に軽微な総計に存在する。ポリクローナル抗体試薬(概して、異なる決定要素(エピトープ)に向けられる異なる抗体を含む)とは対照的に、单クローン抗体準備の各々の单クローン抗体を、テスト上の单一の決定要素にあてる。このように、修飾子「モノクローナル抗体」は、抗体の実質的に均一な人口から得られるとして抗体の特徴を示して、いかなる特定の方法にもよって抗体の生産を必要とするものとして解釈されることになつていい。例えは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座、この種の方法および他の典型的な方法の遺伝子導入実験動物を含んでいる全部または一部を本願明細書において記載されている单クローン抗体を作ることのために利用しているハイブリードーマ法、組換えDNA方法、バクテリオファージ-表示方法および方法を含むがこれに限らず、本発明によ

40

50

れば使用される单クローン抗体は、種々の技術によって作られることができる。

【0074】

「裸の抗体」は、異形の部分(例えば細胞毒の部分)または放射標識に接合されない抗体に関連する。裸の抗体は、製薬製剤に存在してもよい。

【0075】

「天然の抗体」は、構造を変化させることに関する自然に起こっている免疫グロブリン分子に関連する。例えば、自国のIgG抗体は約150,000のダルトンのヘテロ四分割のグリコプロテインである。そして、ジスルフィド保税倉庫留め置きである2つの同一のH鎖及び2つの同一のL鎖から成る。N-からC末端まで、各々のH鎖は可変部(VH)を有する。そして、また、可変的な重い領域またはH鎖可変ドメインと呼ばれている。そして、3つの不变領域(CH1、CH2およびCH3)が続く。同様に、N-からC末端まで、各々のL鎖は可変部(VL)を有する。そして、また、可変的な明るい領域またはL鎖可変ドメインと呼ばれている。そして、恒常的な明るい(CL)領域が続く。抗体のL鎖は、2つのタイプ(その不变領域のアミノ酸配列に基づいて、ラムダ(λ)及びカッパ(κ)と呼ばれている)のうちの1つに割り当てられることができる。

10

【0076】

「パッケージ挿入物」なる用語は、慣習的に、治療的な製品(この種の治療的な製品の使用法に関する徴候、使用、投薬量、管理、複合治療、禁忌および/または警告に関する情報を含む)の市販パッケージに含まれる指示に関連するために用いる。

20

【0077】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を達成するために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって著作され、そのソースコードは米国著作権庁(ワシントンD.C., 20559)に使用者用書類と共に提出され、米国著作権登録番号TUX510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社(サウスサンフランシスコ、カリフォルニア)から公的に入手可能であり、又はソースコードからコンパイルされうる。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

30

【0078】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対するある程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

40

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合

50

、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることが理解されるであろう。特に断らない限りは、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

【0079】

「薬学的製剤」なる用語は、有効成分の生物学的活性度ができるようにするために、効果的であるためにその中で含むような形である、そして、製剤が投与される主題に容認できないほど有毒である付加的な構成要素を含まない準備に関連する。

【0080】

有効成分以外の、「薬学的に許容可能な担体」は製薬製剤の成分に関連する。そして、それは被験体に対する非毒性である。薬学的に受け入れられるキャリアは、バッファ、賦形剤、スタビライザまたは防腐剤を含むが、これに限定されるものではない。

【0081】

ここで使用しているように、「治療」(及びその文法のバリエーション(例えば「治療」または「治療する」))は、治療されている個人の自然のコースを変える試みへの臨床介入に関連して、予防のために臨床病理学のコースの間、実行されることができる。処理の望ましい効果は疾患の発生または再発を予防することを含むが、これに限定されるものではない。そして、症状(疾患のいかなる直接的または間接的な病理学的結果もの減少)の緩和が転移を予防する。そして、緩解または改良された予後及び、疾病状態の疾患進行、改善または一時的緩和の率を低下させる。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患の発現を遅延させるかまたは疾患の進行を減速するために用いる。

【0082】

「腫瘍」なる用語は、全ての前癌でガン細胞および組織及び、悪性であるか良性であるにせよ、増殖及び全ての新生物形成細胞発育に関連する。本願明細書において関連されるように、条件「癌」、「癌性」、「細胞増殖障害」、「増殖性障害」及び「腫瘍」は排他的でない。

【0083】

「可変領域」又は「可変ドメイン」なる用語は、抗体をテストに結合することに関係している重い抗体またはL鎖の領域に関連する。3つの高度変異部(HVRs)及び4つの保全されたフレームワーク地方(FRs)から成る各々の領域については、天然の抗体のL鎖(VL及びVH、それぞれ)及びH鎖の可変ドメインは、一般に類似した構造を有する。(Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照)単一のVHまたはVL領域は、テスト結合性特異性を与えるのに十分でもよい。さらにまた、特定のテストを結合する抗体は、それぞれ、補完的なVLまたはVH領域のライブラリを放送するためにテストを結合する抗体からVHまたはVL領域を使用して分離されることができる。Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)を参照。

【0084】

本願明細書において使われるよう、「ベクトル」なる用語ははそれが連結される他の核酸を伝播することができる核酸分子に関連する。項は、それが導かれた宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクトルと同様に、自己再生する核酸構造としてベクトルを含む。特定のベクトルは、それらが有効に連結される核酸の表現度を導くことができる。この種のベクトルは、本明細書において、「発現ベクトルと称される。」

【0085】

「VHサブグループIIICンセンサスフレームワーク」は、Kabat et al.の可変重サブグループIIICのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含む。一実施態様では、VHサブグループIIICンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、次の配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(配列番号：13)-H1-WVRQAPGKGLEWV(配列番号：14)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC(配列番号：15)-H3-WGQGTLVTVSS(配列番号：1

10

20

30

40

50

6)の各々の少なくとも一部又は全てを含む。

【0086】

「V L サブグループ I コンセンサスフレームワーク」は、Kabat et alの可変軽カッパサブグループ I におけるアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含む。一実施態様では、V H サブグループ I コンセンサスフレームワークアミノ酸配列は次の配列：D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C (配列番号：28) - L 1 - W Y Q Q K P G K A P K L L I Y (配列番号：29) - L 2 - G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C (配列番号：30) - L 3 - F G Q G T K V E I K (配列番号：31)の各々の一部又は全てを含む。

【0087】

「消耗性」障害なる用語は(例えば消耗性症候群、悪液質、サルコペニア)は、望まない及び/又は不健康な体重の減少又は体細胞量の減少を指す。高齢者並びにAIDS及び癌患者では、消耗性疾患は、脂肪及び除脂肪区画の双方を含む望まない体重の減少をもたらしうる。消耗性疾患は、疾病及び/又は老化過程に関連する不十分な食品の摂取及び/又は代謝性変化から生じうる。癌患者及びAIDS患者、並びに広範囲の手術後又は慢性感染症、免疫疾患、甲状腺機能亢進症、クローアン病、心因性疾患、慢性心不全又は他の重症な外傷を有する患者はしばしば、悪液質、代謝性及び時に摂食障害とも呼ばれる消耗性障害を患う。悪液質はまた代謝亢進及び異化亢進によって特徴づけられる。悪液質及び消耗性疾患は消耗性状態を指すのにしばしば互換的に用いられるが、除脂肪体重、特に体細胞量の減少として消耗症候群から悪液質を区別する少なくとも一体の研究がある (Mayer, 1999, J. Nutr. 129(1S Suppl.):256S-259S)。加齢個体に影響するまた別のこのような障害であるサルコペニアは、筋量の減少によって典型的に特徴づけられる。上記の末期消耗性疾患は悪液質又はサルコペニアを患っている個体において発生しうる。

【0088】

I I . 組成物及び方法

一態様では、発明は一部には、様々なFGFR4結合剤(例えば抗体及びその断片)の同定に基づく。ある実施態様では、FGFR4に結合する抗体が提供される。発明の抗体は、例えば癌、肝臓疾患、及び消耗の診断又は治療に有用である。

【0089】

A . 例示的な抗FGFR4抗体

一態様では、発明はFGFR4に結合する単離された抗体を提供する。

【0090】

ある実施態様では、抗FGFR4抗体は1nMの親和性でヒトFGFR4に結合する。幾つかの実施態様では、抗FGFR4抗体は0.05nMの親和性でヒトFGFR4に結合する。

【0091】

ある実施態様では、抗FGFR4抗体は1nMの親和性でマウスFGFR4に結合する。

【0092】

ある実施態様では、抗FGFR4抗体は1nMの親和性でカニクイザルFGFR4に結合する。

【0093】

ある実施態様では、抗FGFR4抗体は1nMの親和性でヒト、マウス及びカニクイザルFGFR4に結合する。

【0094】

ある実施態様では、抗FGFR4抗体はヒトFGFR1、ヒトFGFR2及び/又はヒトFGFR3に実質的に結合しない。ある実施態様では、抗FGFR4抗体はヒトFGFR1、ヒトFGFR2及び/又はヒトFGFR3にほとんどあるいは全く結合を示さない。

【0095】

10

20

30

40

50

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はマウス C 3 タンパク質(幾つかの実施態様では、図 12 D に示すアミノ酸配列を有するマウス C 3 タンパク質)に実質的に結合しない。ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はマウス C 3 タンパク質(幾つかの実施態様では、図 12 D に示すアミノ酸配列を有するマウス C 3 タンパク質)にほとんどあるいは全く結合を示さない。

【0096】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はヒト化抗 F G F R 4 抗体であり、ヒト F G F R 4 への抗体の一価の親和性は、それぞれ配列番号：8 及び 7 に記載される軽鎖及び重鎖可変配列を含んでなるマウス抗体の一価の親和性と実質的に同じである。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はヒト化及び親和性成熟抗体である。

10

【0097】

ある実施態様では抗 F G F R 4 抗体は F G F R 4 活性のアンタゴニストである。

【0098】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は F G F R 4 への F G F 結合を阻害する。幾つかの実施態様では、F G F R 4 への F G F 1 及び / 又は F G F 19 結合が阻害される。幾つかの実施態様では、F G F R 4 への F G F 1 結合の阻害の I C 50 は約 0.10 nM である。幾つかの実施態様では、F G F R 4 への F G F 19 結合の阻害の I C 50 は約 0.10 nM である。

【0099】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は細胞増殖を阻害する。幾つかの実施態様では、増殖は F G F - 誘導細胞増殖である。幾つかの実施態様では、細胞増殖は B A F 3 / F G F R 4 トランスジェニック細胞増殖である。

20

【0100】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は F G F R 4 を発現する細胞の F G F (例えば F G F 1) 刺激増殖を阻害する。幾つかの実施態様では、細胞は H U H 7 細胞である。

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は、F G F 19 に曝露された細胞における C Y P 7 7 発現の F G F 19 - 媒介阻害を阻害する。

【0101】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は、F G F 19 に曝露された細胞における F G F R 4 、 M A P K 、 F R S 2 及び / 又は E R K 2 の F G F 19 - 誘導リン酸化を阻害する。

30

【0102】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は F G F 19 - 誘導コロニー形成を阻害する。幾つかの実施態様では、コロニー形成は H C C 細胞株コロニー形成である。幾つかの実施態様では、H C C 細胞株は J H H 5 である。

【0103】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は変性 F G F R 4 に結合する。幾つかの実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は還元、変性 F G F R 4 に結合する。幾つかの実施態様では、還元、変性 F G F R 4 の結合はウエスタンプロットを使用してアッセイされる。

【0104】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は細胞表面で発現された F G F R 4 に結合する。幾つかの実施態様では、細胞は H U H 7 又は J H H 5 細胞である。

40

【0105】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は G 1 6 5 A 変異を含んでなるヒト F G F R 4 に実質的に結合しない。ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は G 1 6 5 A 変異を含んでなるヒト F G F R 4 にほとんどあるいは全く結合しない。

【0106】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は、アミノ酸番号 1 5 0 ~ 1 7 0 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなる、から基本的に成る又はから成るポリペプチドに結合する。ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はアミノ酸番号 1 4 5 ~ 1 8 0 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなる、から基本的に成る又はから成るポリペプチドに結合す

50

る。

【0107】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はアミノ酸番号 150～170 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなる、から基本的に成る又はから成る配列と少なくとも 70% , 80% , 90% , 95% , 98% の配列同一性又は類似性を有するポリペプチドに結合する。ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体はアミノ酸番号 145～180 の成熟ヒト F G F R 4 アミノ酸配列を含んでなる、から基本的に成る又はから成る配列と少なくとも 70% , 80% , 90% , 95% , 98% の配列同一性又は類似性を有するポリペプチドに結合する。

【0108】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は F G F R 4 二量体化を阻害する。

【0109】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は F G F R 4 二量体化界面で結合する。

【0110】

ある実施態様では、抗 F G F R 4 抗体は腫瘍増殖を阻害する。幾つかの実施態様では、腫瘍増殖は肝臓腫瘍増殖である。

【0111】

一態様では、発明は、(a) N H W M N のアミノ酸配列(配列番号：1)を含んでなる H V R - H 1 ; (b) M I L P V D S E T T L E Q K F K D のアミノ酸配列(配列番号：2)を含んでなる H V R - H 2 ; (c) G D I S L F D Y のアミノ酸配列(配列番号：3)を含んでなる H V R - H 3 ; (d) R T S Q D I S N F L N のアミノ酸配列(配列番号：4)を含んでなる H V R - L 1 ; (e) Y T S R L H S のアミノ酸配列(配列番号：5)を含んでなる H V R - L 2 ; 及び(f) Q Q G N A L P Y T のアミノ酸配列(配列番号：6)を含んでなる H V R - L 3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6 の H V R を含んでなる抗 F G F R 4 抗体を提供する。

【0112】

一態様では、発明は(a)配列番号：1 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 1 ; (b) 配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 2 ; 及び(c)配列番号：3 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 3 から選択される少なくとも 1、少なくとも 2、又は全 3 つの V H H V R 配列を含んでなる抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号：3 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 3 を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号：3 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 3 及び配列番号：6 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 3 を含む。更なる実施態様では、抗体は、配列番号：3 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 3 、配列番号：6 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 3 、及び配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 2 を含む。更なる実施態様では、抗体は、(a)配列番号：1 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 1 ; (b) 配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 2 ; 及び(c)配列番号：3 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 3 を含む。

【0113】

別の態様では、発明は、(a)配列番号：4 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 1 ; (b) 配列番号：5 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 2 ; 及び(c)配列番号：6 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 3 から選択される少なくとも 1、少なくとも 2、又は全 3 の V L H V R 配列を含んでなる抗体を提供する。

【0114】

一実施態様では、抗体は、(a)配列番号：4 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 1 ; (b) 配列番号：5 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 2 ; 及び(c)配列番号：6 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - L 3 を含む。

【0115】

別の態様では、発明の抗体は、(a)(i)配列番号：1 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 1 、(i i)配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでなる H V R - H 2 、及び(i i i)

10

20

30

40

40

50

配列番号：3から選択されるアミノ酸配列を含んでなるHVR-H3から選択される少なくとも1、少なくとも2、又は全3つのVH HVR配列を含んでなるVHドメイン；及び(b)(i)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1、(ii)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2、及び(c)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3から選択される少なくとも1、少なくとも2、又は全3つのVL HVR配列を含んでなるVLドメインを含む。

【0116】

別の態様では、発明は、(a)配列番号：1のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H1；(b)配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H2；(c)配列番号：3のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H3；(d)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1；(e)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2；及び(f)配列番号：6から選択されるアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3を含んでなる抗体を提供する。

10

【0117】

別の態様では、抗FGFR4抗体は、EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGYTFTNHWMNWVRQAPGKGLEWVGMIPLPVDS
KFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGDIS
LFDYWGQGT
LVT
VSS (配列番号：7)のアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。

20

【0118】

ある実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一性を有するVH配列は、参照配列と比較して置換(例えば、保存的置換)、挿入、又は欠失を有するが、その配列を含んでなる抗FGFR4抗体はFGFR4に結合する能力を保つ。ある実施態様では、合計で1~10アミノ酸が配列番号：7において置換、挿入及び/又は欠失されている。ある実施態様では、置換、挿入又は欠失はHVR外の領域において(すなわちFRにおいて)生じる。場合によっては、抗FGFR4抗体は、配列番号：7におけるVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様では、(a)配列番号：1のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H1、(b)配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H2、及び(c)配列番号：3のアミノ酸配列を含んでなるHVR-H3から選択される1、2、又は3のHVRを含む。

30

【0119】

別の態様では、抗FGFR4抗体であって、DIQMTQSPSSLSASVGDRV
TITCRTSQDISNFLNWYQQKPGKAFKILISYTSRLHSGVP
SRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNALPYTFG
QGTTKVEIKR(配列番号：8)のアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗体が提供される。

40

【0120】

ある実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列と比較して置換(例えば、保存的置換)、挿入、又は欠失を有するが、その配列を含んでなる抗FGFR4抗体はFGFR4に結合する能力を保つ。ある実施態様では、合計で1~10アミノ酸が配列番号：8において置換、挿入及び/又は欠失されている。ある実施態様では、置換、挿入又は欠失はHVR外の領域において(すなわちFRにおいて)生じる。場合によっては、抗FGFR4抗体は、配列番号：8におけるVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様では、VLは(a)配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L1；(b)配列番号：5のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L2；及び(c)配列番号：6のアミノ酸配列を含んでなるHVR-L3から選択される1、2又は3のHVRを

50

含む。

【0121】

別の態様では、抗FGFR4抗体であって、上記の実施態様の何れかに記載のVH、及び上記の実施態様の何れかに記載のVLを含む抗体が提供される。一実施態様では、抗体はそれぞれ配列番号：7及び配列番号：8におけるVH及びVL配列を含み、これらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0122】

何れかの上記の実施態様では、抗FGFR4抗体はヒト化である。一実施態様では、抗FGFR4抗体は上記の実施態様の何れかに記載のHVRを含み、更にアクセプターヒトフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。発明の抗体は、何れかの好適なフレームワーク可変ドメイン配列を含むが、FGFR4への結合活性が実質的に保たれているとする。例えば、幾つかの実施態様では、発明の抗体はヒトサブグループI I I重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は位置71、73、及び/又は78に置換を含む。これらの抗体の幾つかの実施態様では、位置71はAであり、73はTであり及び/又は78はAである。一実施態様では、これらの抗体は、huMAb4D5-8の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(HERCEPTIN(登録商標), Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (also referred to in U.S. Patent No. 6,407,213 & 5,821,337, and Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093)。一実施態様では、フレームワーク配列は次のアクセプターヒトフレームワーク：D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C (配列番号：9) - L 1 - W Y Q Q K P G K A F K I L I S (配列番号：10) - L 2 - G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C (配列番号：11) - L 3 - F G Q G T K V E I K (配列番号：12)を含む。

10

20

20

【0123】

更なる態様では、発明はここに提供される抗FGFR4抗体と同じエピトープに結合する抗FGFR4抗体が提供される。例えば、ある実施態様では、配列番号：7のVH配列及び配列番号：8のVL配列を含んでなる抗FGFR4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様では、図18に示す配列(配列番号：39)のアミノ酸145-180から成るFGFR4の断片内のエピトープに結合する抗体が提供される。

30

【0124】

更なる態様では、発明は、配列番号：7のVH配列及び配列番号：8のVL配列を含んでなる抗FGFR4抗体と、ヒトFGFR4への結合について競合する抗FGFR4抗体を提供する。

発明の更なる態様では、上記実施態様の何れかによる抗FGFR4抗体はモノクローナル抗体であり、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含む。一実施態様では、抗FGFR4抗体は抗体断片、例えばFv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はFab(ab')₂断片である。別の実施態様では、抗体は完全長抗体、例えばインタクトなIgG1抗体又はここに定義される他の抗体クラス又はアイソタイプである。

40

【0125】

更なる態様では、上記実施態様の何れかによる抗体は、下のセクション1-7に記載される何れかの特性を単独で又は組合せにおいて組み込みうる。

【0126】

1. 抗体親和性

ある実施態様では、ここに提供される抗体は 1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、又は 0.001 nM(例えば10⁻⁸ M以下、例えば10⁻⁸ Mから10⁻¹³ M、例えば10⁻⁹ Mから10⁻¹³ M)の解離定数(Kd)を有している。

【0127】

一実施態様では、Kdは、次のアッセイによって記載されるように、対象の抗体のFa

50

b型とその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、一連の力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(¹⁻²⁻⁵I)標識抗原でFabを均衡にし、ついで抗Fab抗体被覆プレートで結合抗原を捕獲することによって測定する(例えばChen等, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)を参照)。アッセイ条件を確率するために、MICROTRITETER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を5μg/mlの50mM炭酸ナトリウム(pH9.6)中の捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)で一晩被覆し、その後PBS中の2%(w/v)のウシ血清アルブミンで室温(およそ23℃)で2から5時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc #269620)において、100pM又は26pMの[¹⁻²⁻⁵I]抗原を段階希釈した対象のFabと混合する(例えば、Presta等, Cancer Res. 57: 4593-4599(1997)における抗VEGF抗体Fab-12の評価と一致する)。ついで対象のFabを一晩インキュベートする;しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでより長い時間(例えば約65時間)継続する場合がある。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。ついで、溶液を取り除き、プレートをPBS中の0.1%ポリソルベート20(Tween-20(登録商標))で8回洗浄した。プレートが乾燥したら、150μl/ウェルの閃光物質(MicroScint-20TM; Packard)を加え、プレートをTOPCOUNTTMカウンター(Packard)で10分間計数する。最大結合の20%か又はそれ以下を与える各Fabの濃度を選択して競合結合測定に用いる。

10

20

30

40

50

【0128】

他の実施態様によれば、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップで25のBIAcore(登録商標)-2000又はBIAcore(登録商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を使用して表面プラスモン共鳴アッセイを行ってKdを測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化する。抗原を10mMの酢酸ナトリウム(pH4.8)で5μg/ml(~0.2μM)に希釈した後、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5μl/分の流量で注入する。抗原の注入後、未反応群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入する。動力学的な測定では、2倍の段階希釈したFab(0.78nMから500nM)を25、およそ25μl/分の流量で0.05%ポリソルベート20(Tween-20TM)界面活性剤(PBST)を含むPBSに注入する。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(kon)と解離速度(koff)を算出する。平衡解離定数(Kd)をkoff/kon比として算出する。例えば、Chen等, J. Mol Biol 293:865-881(1999)を参照のこと。上記の表面プラスモン共鳴アッセイにより結合速度が10⁶M⁻¹S⁻¹を上回る場合、分光計、例えば、ストップフロー具備分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、PBS(pH7.2)、25の、20nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295nm; 放出=340nm、バンドパス=16nm)の増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

【0129】

2. 抗体断片

ある実施態様では、ここに提供される抗体は抗体断片である。抗体断片は、限定しないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及びscFv断片、及び以下に記載の他の断片を含む。所定の抗体断片の概説については、Hudson等 Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照のこと。scFv断片の概説については、例えばPluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編,(Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照のこと;また国際公開第93/16185

号；及び米国特許第5571894号及び第5587458号を参照のこと。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含みインビオ半減期が増加したF_{ab}及びF(a_{b'})₂断片の検討については、米国特許第5869046号を参照のこと。

【0130】

ダイアボディは、二価又は二重特異性でありうる二つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許出願公開第404097号；国際公開第1993/01161号；Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照のこと。トリアボディ及びテトラボディはまたHudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

【0131】

単一ドメイン抗体は抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。ある実施態様では、単一ドメイン抗体はヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば米国特許第6248516B1号を参照)。

【0132】

抗体断片は、限定しないが、ここに記載されるようにインタクトな抗体のタンパク質消化並びに組換え宿主細胞(例えば大腸菌又はファージ)による生産を含む様々な技術によって作製されうる。

【0133】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様では、ここで提供される抗体はキメラ抗体である。あるキメラ抗体は、例えば米国特許第4816567号；及びMorrison等, PNAS USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例では、キメラ抗体は非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト靈長類、例えばサル由来の可変領域)とヒト定常領域を含む。更なる例では、キメラ抗体はクラス又はサブクラスが親抗体のものとは変化せられた「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体はその抗原結合断片を含む。

【0134】

ある種の実施態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させるためにヒト化される。一般的に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR(又はその一部)が非ヒト抗体由来であり、FR(又はその一部)がヒト抗体配列由来である一又は複数の可変ドメインを含む。場合によっては、ヒト化抗体は、ヒト定常領域の少なくとも一部を含むであろう。幾つかの実施態様では、ヒト化抗体における幾つかのFR残基は、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が誘導される抗体)からの対応する残基で置換され、例えば抗体特異性又は親和性が回復又は改善される。

【0135】

ヒト化抗体及びそれを作製する方法は、例えばAlmagro 及び Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に概説されており、更に例えば、Riechmann等, Nature 332:323-329 (1988)；Queen等, PNAS USA 86:10029-10033 (1989)；米国特許第5821337号、同7527791号、同6982321号、及び同7087409号；Kashmiri等, Methods 36:25-34 (2005)(SDR(a-CDR)グラフトを記載)；Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)(「リサーフェシング(resurfacing)」を記載)；Dall'Acqua等, Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記載)；及びOsbourne等, Methods 36:61-68 (2005) 及び Klimka等, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)(FRシャッフリングに対する「案内選別(guided selection)」アプローチ法を記載)に記載されている。

【0136】

ヒト化に使用されうるヒトフレームワーク領域には、限定されるものではないが、「ベストフィット法」を使用して選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims等 J. Immunol. 151:2296 (1993)を参照)；軽鎖又は重鎖可変ドメインの特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導されるフレームワーク領域(例えば、Carter等 PNAS USA, 89

10

20

30

40

50

:4285 (1992) ; 及び Presta等 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)) ; ヒト成熟(体細胞的に変異された)フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域(例えば、Almagro及びFransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)を参照) ; 及び F R ライブラリーのスクリーニング由来のフレームワーク領域(例えば、Baca等, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 及び Rosok等, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)を参照)が含まれる。

【0137】

4. ヒト抗体

ある実施態様では、ここで提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で知られている様々な技術を使用して產生せしめることができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk及びvan de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)に記載されている。

10

【0138】

ヒト抗体は、抗原投与に反応してインタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を產生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫源を投与することによって調製することができる。このような動物は、ヒト免疫グロブリン座位の全て又は一部を典型的には含み、内在性免疫グロブリン座位を置き換えるか、又は染色体外、又は動物の染色体内にランダムに組み込まれて存在する。このようなトランスジェニックマウスにおいて、内在性免疫グロブリン座位は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得る方法の概説は、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)を参照のこと。また、XENOMOUSETM技術を記載する米国特許第6075181号及び同6150584号；HUMAB(登録商標)技術を記載した米国特許第5770429号；K-MOUSE(登録商標)技術を記載した米国特許第7041870号；VELOCIMOUSE(登録商標)技術を記載した米国特許出願公開第2007/0061900号を参照。このような動物により產生されるインタクトな抗体からのヒト可変領域は、例えば異なるヒト定常領域と組合せることにより、更に修飾することができる。

20

【0139】

また、ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法により作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及びBoerner等, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)を参照)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して產生されるヒト抗体は、Li等, *PNAS. USA*, 103:3557-3562 (2006)にまた記載されている。付加的な方法には、例えば米国特許第7189826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の生産を記載)、及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載)に記載されている。また、ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)は、Vollmers 及びBrandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 及び Vollmers及びBrandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)にも記載されている。

30

【0140】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することにより產生せしめることもできる。ついで、このような可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組合せられうる。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術を以下に記載する。

40

【0141】

5. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し、所望の結合特性を有する抗体について、そのようなライブラリーをス

50

クリーニングするための様々な方法が当該技術分野で知られている。このような方法は、例えばHoogenboom等 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)において概説され、更に例えばMcCafferty等, *Nature* 348:552-554 ; Clackson等, *Nature* 352: 624-628 (1991) ; Marks等, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992) ; Marks及びBradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175(Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003) ; Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004) ; Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, *PNAS USA* 101(34): 12467-12472 (2004) ; 及びLee等, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。

【0142】

ある種のファージディスプレイ法では、V H 及びV L 遺伝子のレパートリーが、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)により別々にクローニングされ、ファージライブラリーにおいてランダムに組換えられ、これがついで、Winter等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)に記載されているように、抗原-結合ファージについてスクリーニングされうる。ファージは、典型的には、単鎖F v (s c F v)断片又はF a b 断片として、抗体断片をディスプレイする。免疫化されたソースからのライブラリーにより、ハイブリドーマを構築する必要なく、免疫原に対して高親和性の抗体が提供される。あるいは、天然レパートリーを、Griffiths等, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)に記載されているように、免疫化をすることなく、広範囲の非自己、更には自己抗原に対するヒト抗体の単一供給源を提供するために(例えばヒトから)クローニングすることができる。最後に、ナイーブライブラリーは、幹細胞から再配置されていないV 遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むP C R プライマーを使用することで合成的に作製することができ、高頻度可変C D R 3 領域をコードし、Hoogenboom 及びWinter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)により記載されているような、再配置をインビトロで達成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許文献には、例えば米国特許第5 7 5 0 3 7 3号、及び米国特許出願第2 0 0 5 / 0 0 7 9 5 7 4号、同2 0 0 5 / 0 1 1 9 4 5 5号、同2 0 0 5 / 0 2 6 6 0 0 0号、同2 0 0 7 / 0 1 1 7 1 2 6号、同2 0 0 7 / 0 1 6 0 5 9 8号、同2 0 0 7 / 0 2 3 7 7 6 4号、同2 0 0 7 / 0 2 9 2 9 3 6号、及び同2 0 0 9 / 0 0 0 2 3 6 0号が含まれる。

【0143】

ヒト抗体ライブラリーから単離される抗体又は抗体断片は、ここでのヒト抗体又はヒト抗体断片と考えられる。

【0144】

6. 多重特異性抗体

ある実施態様では、ここで提供される抗体は多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある種の実施態様では、結合特異性の一つはF G F R 4 に対してであり、他方は任意の他の抗原に対してである。ある実施態様では、二重特異性抗体は、F G F R 4 の二つの異なるエピトープに結合しうる。また二重特異性抗体はF G F R 4 を発現する細胞に細胞傷害剤を局在化させるために使用することができる。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

【0145】

多重特異性抗体を作製するための技術には、限定されるものではないが、異なる特異性を有する二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え同時発現(Milstein及びCuello, *Nature* 305: 537 (1983)を参照)、国際公開第9 3 / 0 8 8 2 9号、及びTraunecker等, *EMBO J.* 10: 3655 (1991))、及び「ノブ-イン-ホール」技術(例えば、米国特許第5 7 3 1 1 6 8号を参照)が含まれる。また、多重特異性抗体は、抗体ヘテロ二量体分子を作製するための静電気操縦効果の設計(国際公開第2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 A 1号)；2又はそれ以上の抗体又は断片の架橋(例えば、米国特許第4 6 7 6 9 8 0号、及びBrennan等, *Science*, 229: 81 (1985)を参照)；二重特異性抗体の产生のためのロイシンジッパーの使用(例えば、Kostelny等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992))；二重特異性抗体断片を作製す

10

20

30

40

50

るための「ダイアボディ」技術の使用(例えば、Hollinger等, PNAS USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)；及び単鎖Fv(sFv)二量体の使用(例えば、Gruber等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照)；及びTutt等 J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているような三重特異性抗体の調製により、作製することができる。

【0146】

「オクトパス抗体」を含む3又はそれ以上の機能的抗原結合部位を有する操作抗体もここに含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照)。

【0147】

また、ここでの抗体又は断片は、FGFR4並びに他の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用FAb」又は「DAF」も含む(例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号を参照)。

10

【0148】

7. 抗体変異体

ある実施態様では、ここに提供される抗体のアミノ酸配列変異体が考えられる。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的性質を改善させることができ望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入して、又はペプチド合成により調製されうる。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば抗原結合性を有している限り、欠失、挿入、及び置換をどのように組合せて、最終コンストラクトに到達してもよい。

20

【0149】

a) 置換、挿入、及び欠失変異体

ある実施態様では、一又は複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発のために関心ある部位はHVR及びFRを含む。保存的置換は、「保存的置換」と題して表1に示す。より実質的な変化は「例示的置換」との項目で表1に提供され、アミノ酸側鎖クラスを基準にして以下に更に記載される。アミノ酸置換は関心ある抗体に導入され得、生成物が所望の活性、例えば保持された/改善された抗原結合性、低減した免疫原性、改善されたADC又はCDCについて、スクリーニングされる。

【0150】

表1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu(L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【0151】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

- (1) 疏水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎮配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0152】

非保存的置換は、これらのクラスの一つのメンバーを他のクラスに交換することを必要とするであろう。

【0153】

一タイプの置換変異体は、親抗体(例えばヒト化又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基を置換することを含む。一般的に、更なる研究のために選択される得られた変異体は、親抗体に対して所定の生物学的性質(例えば親和性の増加、免疫原性の減少)に修飾(例えば改善)を有するか、及び/又は親抗体の実質的に保持された所定の生物学的性質

10

20

30

40

50

を有しているであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、これは、例えばここに記載されたもののようなファージディスプレイベースの親和性成熟技術を使用して簡便に產生せしめることができる。簡潔に言えば、一又は複数のHVR残基を変異させ、変異体抗体をファージにディスプレイさせ、特定の生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。

【0154】

改変(例えば置換)は、例えば抗体親和性を改善するために、HVRにおいてなされうる。このような改変はHVR「ホットスポット」、つまり体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基(例えばChowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)を参照)、及び/又はSDRs(a-CDRs)においてなされる場合があり、得られる変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築しそれから再選択することによる親和性成熟は、例えばHoogenboom等 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等編, Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様では、様々な方法(例えばエラープローンPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発)の何れかによつて成熟のために選択された可変遺伝子中に多様性が導入される。ついで、二次抗体が作製される。ついで、ライブラリーがスクリーニングされ、所望の親和性を有する任意の抗体変異体が同定される。多様性を導入する他の方法は、幾つかのHVR残基(例えば一度に4-6残基)が無作為化されるHVR指向性アプローチを含む。抗原結合に關与するHVR残基が、例えばアラニンスキャン突然変異誘発又はモデリングを使用して、特に同定されうる。特にCDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的とされる。

10

20

30

【0155】

ある実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、一又は複数のHVR内で生じうる。例えば、結合親和性を実質的に減少させない保存的改変(例えばここで提供される保存的置換)をHVRにおいてなすことができる。そのような改変はHVR「ホットスポット」又はSDRの外側であります。上に提供された変異VH及びVL配列の所定の実施態様では、何れかの各HVRが改変されず、又は一、二又は三のアミノ酸置換を含む。

【0156】

突然変異誘発の標的とされうる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) *Science* 244:1081-1085 (1989)によって記載されている「アラニンスキャンニング突然変異誘発法」と呼ばれる。この方法において、残基又は標的残基の群(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電残基)が同定され、中性の又は負に荷電したアミノ酸(例えばアラニン又はポリアラニン)で置換され、抗体の抗原との相互作用に影響があるかどうかが決定される。最初の置換に対して機能的感受性を示しているアミノ酸位置に更なる置換を導入することができる。あるいは、又は附加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造が抗体と抗原間の接触点を同定する。そのような接觸残基及び近傍の残基は置換のための候補として標的にされるか又は削除されうる。変異体は、それらが所望の性質を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされうる。

30

40

【0157】

アミノ酸配列挿入は、長さが1残基から百以上の残基を含むポリペプチドまで及ぶアミノ末端及び/又はカルボキシ末端融合体、並びに单一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を有する抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増加させる酵素(例えばADEPT)又はポリペプチドへの抗体のN又はC末端の融合を含む。

【0158】

b) グリコシル化変異体

ある実施態様では、ここで提供される抗体は、抗体がグリコシル化される度合いを増大又は減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を、一又は複数のグリコシル化部位が作られ又は除去されるように改変されること

50

によって、簡便に達成されうる。

【0159】

抗体がF c領域を含む場合、そこに結合される炭水化物が改変されうる。哺乳動物細胞により産生される天然抗体は、典型的には、F c領域のC H 2ドメインのA s n 2 9 7に對してN結合により一般的に結合する分枝状で二分岐のオリゴ糖を含む。例えば、Wright等 TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は様々な炭水化物、例えばマンノース、N-アセチルグルコサミン(G 1 c N A c)、ガラクトース、及びシアル酸を含み得、並びにフコースが二分岐オリゴ糖構造の「幹」のG 1 c N A cに結合される。幾つかの実施態様では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾が、ある改善された特性を有する抗体変異体を生じせしめるために、なされうる。

10

【0160】

一実施態様では、F c領域に(直接又は間接的に)結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、又は20%から40%でありうる。フコースの量は、例えば国際公開第2008/077546号に記載されているように、M A L D I - T O F質量分析法によって測定して、A s n 2 9 7(例えば複合のハイブリッド及び高マンノース構造)に結合した全ての糖構造の合計に対してA s n 2 9 7の糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。A s n 2 9 7はF c領域内の約297位(F c領域のE u番号付け)に位置したアスパラギン残基を意味する;しかしながら、A s n 2 9 7は、抗体中のマイナーな配列変異のために、297位から約±3アミノ酸上流又は下流に、つまり294位と300位の間に位置している場合がありうる。そのようなフコシル化変異体は改変されたA D C C機能を有しうる。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.);米国特許出願公開第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照。「脱フコシル化された」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連した刊行物の例には、米国特許出願公開第2003/0157108号;国際公開第2000/61739号;国際公開第2001/29246号;米国特許出願公開第2003/0115614号;米国特許出願公開第2002/0164328号;米国特許出願公開第2004/0093621号;米国特許出願公開第2004/0132140号;米国特許出願公開第2004/0110282号;米国特許出願公開第2004/0109865号;国際公開第2003/085119号;国際公開第2003/084570号;国際公開第2005/053742号;国際公開第2002/031140号;Okazaki等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)が含まれる。脱フコシル化抗体を生産可能な細胞株の例には、タンパク質フコシル化に欠けているL e c 1 3 C H O細胞(Ripka等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986);米国特許出願公開第2003/0157108 A 1号, Presta, L;及び国際公開第2004/056312 A 1号, Adams等, 特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F U T 8、ノックアウトC H O細胞(例えば、Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004);Kanda, Y等, Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006);及び国際公開第2003/085107号を参照)が含まれる。

20

【0161】

例えば抗体のF c領域に結合した二分オリゴ糖がG 1 c N A cにより二分される二分オリゴ糖を有する抗体変異体が更に提供される。そのような抗体変異体は、フコシル化が低減され、及び/又はA D C C機能が改変されている場合がある。そのような抗体変異体の例は、例えば国際公開第2003/011878号(Jean-Mairet等);米国特許第6602684号(Umana等);及び米国特許出願公開第2005/0123546号(Umana等)に記載されている。F c領域に結合したオリゴ糖に少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改変されたC D C機能を有している場合がある。このような抗体変異体は、例えば国際公開第1997/30087号(Pat

30

40

50

el等)；国際公開第1998/58964号(Raju, S.)；及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

【0162】

c) Fc領域変異体

ある実施態様では、一又は複数のアミノ酸修飾が、ここに提供される抗体のFc領域に導入され、それによりFc領域変異体を產生せしめてもよい。Fc領域変異体は、一又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含んでなるヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4Fc領域)を含みうる。

【0163】

ある実施態様では、本発明は、幾つかであるが全てではないエフェクター機能を持つ抗体変異体を考察し、これは、抗体を、インビボでの抗体の半減期は重要であるが、あるエフェクター機能(例えば、補体及びADCC)は不要か又は有害である用途のために望ましい候補とする。CDC及び/又はADCC活性の減少/喪失を確認するために、インビトロ及び/又はインビボ細胞傷害性アッセイが実施されうる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠く(よってADCC活性を欠くと思われる)が、FcRn結合能力を保持していることを確かめるために実施されうる。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞はFcRINIのみを発現するのに対し、単球はFc

I、FcII及びFcIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するための非限定的なインビトロアッセイが米国特許第5500362号(例えばHellstrom, I.等 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照)及びHellstrom, I等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337(Bruggemann, M.等, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照)に記載されている。別法では、非放射性アッセイ法が用いられ得る(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; 及びCytoTox96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照)。このようなアッセイのために有用なエフェクター細胞は、末梢血单核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)に記載されているような動物モデルにおいてインビボで評価されうる。C1q結合アッセイが、抗体がC1qに結合できず、よってCDC活性を欠くことを確認するためにまた実施されうる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施することができる(例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S.等, Blood 101:1045-1052 (2003); 及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照)。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期定量も当該技術分野で知られている方法を使用して実施することができる(例えば、Petkova, S.B.等, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照)。

【0164】

減少したエフェクター機能を有する抗体は、Fc領域残基238、265、269、270、297、327及び329の一又は複数の置換を有するものを含む(米国特許第737056号)。このようなFc変異体は、二又はそれ以上のアミノ酸位265、269、270、297及び327に置換を有するFc変異体を含み、アラニンへの残基265及び297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体を含む(米国特許第7332581号)。

【0165】

FcRへの改良又は減少された結合を有するある種の抗体変異体が記載されている(例えば米国特許第6737056号；国際公開第2004/056312号、及びShields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照)。

10

20

30

40

50

【0166】

ある実施態様では、抗体変異体は、ADCを改善する一又は複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び/又は334での置換(残基のEU番号付け)を有するFc領域を含む。

【0167】

幾つかの実施態様では、例えば米国特許第6194551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に記載されているように、改変された(つまり、改善され又は減少した)C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害性(CDC)を生じる改変がFc領域に改変がなされる。

【0168】

増加した半減期及び胎児への母性IgGsの移動に関する新生児Fcレセプター(FcRn)(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))への改変された結合性を有する抗体が、米国特許出願公開第2005/0014934A1(Hinton等)に記載されている。その抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改変する一又は複数の置換をそこに有するFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域残基: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の一又は複数での置換、例えばFc領域残基434の置換を有するものを含む(米国特許第7371826号)。

10

【0169】

Fc領域変異体の他の例に関しては、Duncan及びWinter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5648260号; 米国特許第5624821号; 及び国際公開第94/29351号も参照のこと。

20

【0170】

d) システイン操作抗体変異体

ある実施態様では、システイン操作抗体、例えば抗体の一又は複数の残基がシステイン残基で置換される「thiomas」を作ることが望ましいことがある。特定の実施態様では、置換される残基が抗体の接近可能な部位で生じる。これらの残基をシステインと置換することによって、反応性チオール基が抗体の接近可能な部位に位置させられ、抗体を他の部分、例えば薬剤部分又はリンカー薬剤部分に結合させ、ここで更に記載されるように免疫コンジュゲートを作るために使用されうる。ある実施態様では、以下の残基の任意の一又は複数がシステインと置換されうる: 軽鎖のV205(カバット番号付け); 重鎖のA118(EU番号付け); 及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システイン操作抗体は、例えば米国特許第7521541号に記載されるようにして、产生されうる。

30

【0171】

e) 抗体誘導体

ある実施態様では、ここに提供される抗体は、当該技術分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。抗体の誘導体化に適した部分は、限定しないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオニアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利でありうる。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でも

40

50

よい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又はタイプは、限定されるものではないが、抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか等を含む、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

【0172】

他の実施態様では、放射線への暴露によって選択的に加熱されうる非タンパク質様部分及び抗体のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質様部分はカーボンナノチューブである(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。放射線は任意の波長のものであってよく、限定するものではないが、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質様部分に近位の細胞が死滅させられる温度まで非タンパク質様部分を加熱する波長が含まれる。

10

【0173】

B. 組換え方法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第4816567号に記載されているように、組換え法及び構成物を使用して製造することができる。一実施態様では、ここに記載される抗FGFR4抗体をコードする単離核酸が提供される。このような核酸は、VLを含んでなるアミノ酸配列及び／又は抗体のVHを含んでなるアミノ酸配列(例えば、抗体の軽及び／重鎖)をコードしてもよい。更なる実施態様では、このような核酸を含んでなる一又は複数のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる実施態様では、このような核酸を含んでなる宿主細胞が提供される。このような一実施態様では、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含んでなるアミノ酸配列及び抗体のVHを含んでなるアミノ酸配列をコードする核酸を含んでなるベクター、又は(2)抗体のVLを含んでなるアミノ酸配列をコードする核酸を含んでなる第一ベクター、及び抗体のVHを含んでなるアミノ酸配列をコードする核酸を含んでなる第2ベクターを含む(例えば、これらによって形質転換される)。一実施態様では、宿主細胞は真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞又はリンパ球系細胞(例えばY0、NS0、Sp20細胞)である。一実施態様では、抗FGFR4抗体の作製方法が提供され、該方法は、上に提供された抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で、培養し、場合によっては宿主細胞(又は宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

20

【0174】

抗FGFR4抗体の組換え生産では、例えば上述のような抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞での更なるクローニング及び／又は発現のために一又は複数のベクターに挿入される。このような核酸は、直ちに単離され、一般的な手順を使用して(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定されうる。

30

【0175】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現のために適した宿主細胞は、ここに記載される原核細胞又は真核細胞である。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要でない場合に、細菌で生産されうる。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、米国特許第5648237号、米国特許第5789199号、及び米国特許第5840523号を参照のこと。(また大腸菌中の抗体断片の発現を記述しているCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254を参照)。発現後、抗体は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離され得、更に精製されうる。

40

【0176】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物が、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が「ヒト化」された菌及び酵母株を含み、部分的に又は完全にヒト化したグリコシル化パターンを持つ抗体の生産を生じる。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 及びLi等, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照。

【0177】

50

グリコシル化抗体の発現のために適した宿主細胞は、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)からもまた誘導される。無脊椎動物細胞の例は、植物及び昆虫の細胞を含む。特にヨウトガ細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と併用されうる多くのバキュロウイルス株が同定されている。

【0178】

植物細胞培養もまた宿主として利用することができる。例えば米国特許第5959177号、同第6040498号、同第6420548号、同第7125978号、及び同第6417429号(遺伝子導入植物において抗体を生産するためのPLANTIBODIESTM技術を記述)を参照。

【0179】

脊椎動物細胞をまた宿主として使用することができる。例えば、懸濁状態で増殖するよう適合化された哺乳動物細胞株が有用な場合がある。有用な哺乳動物細胞株の他の例は、SV40(COS-7)によって形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胚腎臓株(Graham等, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)に記載された293又は293細胞)；ベビーハムスター腎細胞(BHK)；マウスセルトリ細胞(例えばMather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)に記載されるTM4細胞)；サル腎細胞(CV1)；アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA)；イヌ腎細胞(MDCK)；バッファローラット肝細胞(BRL3A)；ヒト肺細胞(W138)；ヒト肝細胞(HepG2)；マウス乳腺腫瘍(MMT060562)；Mather等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)に記載されるTRI細胞；MRC-5細胞；及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR-CHO細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及びY0、NS0、及びSp2/0等のミエローマ細胞株である。抗体生産のために適した哺乳類動物宿主細胞株の概説として、例えばYazaki及びWu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp255-268 (2003)を参照のこと。

【0180】

C. アッセイ

ここに提供されている抗FGFR4抗体は、当分野で知られている様々なアッセイによってそれらの物理的/化学的特性及び/又は生物学的活性について同定、スクリーニング、又は特徴付けされうる。

1. 結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、発明の抗体は、知られている方法、例えばELISA、ウエスタンプロットなどによってその抗原結合活性について試験される。

別の態様では、競合アッセイが、FGFR4への結合について抗体LD1と競合する抗体を同定するために使用されうる。ある実施態様では、このような競合抗体は抗体LD1に結合される同じエピトープ(例えば線形又は立体構造エピトープ)に結合する。抗体が結合するエピトープのマッピングのための詳細な例示的方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

例示的な競合アッセイでは、固定化FGFR4が、FGFR4(例えば抗体LD1)に結合する第一標識抗体及びFGFR4への結合について第一抗体と競合するその能力について試験されている第二標識抗体を含んでなる溶液中においてインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在しうる。コントロールとして、固定化FGFR4が、第一標識抗体を含むが第二非標識抗体を含まない溶液中においてインキュベートされる。FGFR4への第一抗体の結合が可能な条件下でのインキュベーション後、過剰な非結合抗体が取り除かれ、固定化FGFR4に伴う標識の量が測定される。固定化FGFR4に伴う標識の量がコントロールサンプルと比較して試験サンプルにおいて実質的に低減されている場合、それは第二抗体がFGFR4への結合について第一抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照のこと。

【0181】

2. 活性アッセイ

一態様では、アッセイは、生物学的な活性を有する抗FGFR4抗体を同定するために提供される。生物学的な活性には、例えば:FGFR4を発現する細胞(例えばHUH7細胞)のFGF(例えばFGF1)刺激増殖、FGF19に曝露された細胞におけるCYP7-7発現のFGF19-媒介阻害、FGF19に曝露された細胞におけるFGFR4、MAPK、FRS2及び/又はERK2のFGF19-誘発リン酸化、及びFGF19-誘発コロニー形成(幾つかの実施態様では、HCC細胞株コロニー形成)の阻害を含みうる。

インピボ及び/又はインピトロにおいてこのような生物学的活性を有する抗体もまた提供される。

10

【0182】

ある実施態様では、発明の抗体がこのような生物学的活性について検査される。このような生物学的活性を検査するためのアッセイがここに記載されている。

ある実施態様では、発明の抗体は、インピトロでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。細胞成長又は増殖の阻害のためのアッセイは当分野で周知である。本明細中に記載の「細胞殺傷」アッセイにて例示した細胞増殖のためのあるアッセイは、細胞生存度を測定する。このようなあるアッセイは、Promega (Madison, WI)から市販されているCellTiter-GloTM発光細胞生存率アッセイである。このアッセイは、代謝活性のある細胞の指標であるATPの存在の量に基づいて生細胞数を決定する。Crouch等 (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第6602677号を参照。アッセイは、自動ハイスクループットスクリーニング(HTS)に用いられるように96-又は384-ウェルフォーマットで行ってもよい。Cree等 (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404を参照。アッセイ手順は、単一の試薬(CellTiter-Glo(登録商標)試薬)を直接培養細胞に加えることを伴う。この結果細胞溶解が生じ、ルシフェラーゼ反応によって生産される発光シグナルが生成される。この発光シグナルは、培養物中に存在する生細胞の数に直接比例している、ATPの存在の量に比例する。データは、ルミノメーター又はCCDカメラ画像デバイスによって記録することができる。発光の結果は相対的な光の単位(RLU)として表す。

20

【0183】

細胞増殖についての他のアッセイは「MTT」アッセイであり、これは、ミトコンドリアレダクターゼによる3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイドのホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。CellTiter-GloTMアッセイのように、このアッセイは、細胞培養物に存在する代謝活性のある細胞の数を表す。例としてMosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63及びZhang等 (2005) Cancer Res. 65: 3877-3882を参照。

30

【0184】

上記いずれかのインピトロアッセイに用いるための細胞には、天然でFGFR4を発現する又はFGFR4を発現するように操作された細胞ないしは細胞株が含まれる。このような細胞には、同じ細胞起源の正常細胞と比べてFGFR4を過剰発現する腫瘍細胞が含まれる。また、このような細胞には、FGFR4を発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)や、正常にFGFR4を発現しないがFGFR4をコードする核酸を形質移入してある細胞株が含まれる。上記いずれかのインピトロアッセイに用いるための本明細書中に挙げる例示的な細胞株には、HCC細胞株HUH7が含まれる。

40

【0185】

一態様では、抗FGFR4抗体は、インピボでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。ある実施態様では、抗FGFR4抗体は、インピボでの腫瘍成長を阻害する能力について試験される。異種移植片モデルなどのインピボモデルシステムが前記の試験のために用いられる。例示的な異種移植片システムでは、好適に免疫を低下させた非ヒト動物、例えば胸腺「ヌード」マウスにヒト腫瘍細胞が導入される。本発明の抗体は動物に投与される。抗体の腫瘍成長を阻害するか又は減少させる能力が測定される。上記の異種移植片システムのある実施態様では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者の腫瘍細胞である。

50

このような異種移植片モデルはOncotest GmbH (Frieberg, Germany)から市販されている。ある実施態様では、ヒト腫瘍細胞は、H U H 7 H C C 腫瘍細胞株などのヒト腫瘍細胞株由来の細胞である。ある実施態様では、皮下投与や、哺乳動物の脂肪体などの好適な部位に移植することによって好適に免疫を低下させた非ヒト動物にヒト腫瘍細胞を導入する。ある実施態様では、ヒト腫瘍細胞は、乳房脂肪パッドなどの好適な部位に皮下注射によって又は移植によって好適に免疫抑制された非ヒト動物に導入される。ある実施態様では、異種移植モデルは例えばここにおいて、またnicholes et al, Am J Pathol 160:2295-2307に記載されるようにFGF19を過剰発現するトランスジェニックマウスである。

【0186】

上記アッセイの何れかは、抗FGFR4抗体の代わりに又は加えて、発明のイムノコンジュゲートを使用して実施されてもよいことが理解される。 10

【0187】

上記アッセイの何れかは、抗FGFR4抗体及び更なる治療剤、例えば化学療法剤を使用して実施されうることが理解される。

【0188】

D. 免疫コンジュゲート

本発明は、また、例えば化学療法剤又は薬物、増殖阻害剤、毒素(例えばタンパク質毒素、酵素的に活性な細菌、真菌、植物、又は動物由来の毒素、又はその断片)、又は放射性同位体のような一又は複数の細胞傷害性薬剤とここでコンジュゲートされる抗体を含む免疫コンジュゲートを提供する。 20

【0189】

一実施態様では、免疫コンジュゲートは、限定しないが、メイタンシノイド(米国特許第5208020号、第5416064号及び欧州特許第0425235B1号を参照)；アウリスタチン、例えばモノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDF(MMAE及びMMAF)(米国特許第5635483号及び同第5780588号及び同第7498298号を参照)；ドラスタチン；カリケアマイシン又はその誘導体(米国特許第5712374号、同第5714586号、同第5739116号、同第5767285号、同第5770701号、同第5770710号、同第5773001号、及び同第5877296号；Hinman等, Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)；及びLode等, Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)を参照)；アントラサイクリン、例えばダウノマイシン又はドキソルビシン(Kratz等, Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)；Jeffrey等, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)；Torgov等, Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)；Nagy等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)；Dubowchik等, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)；King等, J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)；及び米国特許第6630579号を参照)；メトトレキセート；ビンデシン；タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル；トリコテシン及びCC1065を含む一又は複数の薬物に抗体がコンジュゲートされる抗体薬剤コンジュゲート(ADC)である。 30

【0190】

他の実施態様では、免疫コンジュゲートは、限定しないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(綠膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAP1、PAP1I、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)阻害剤、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サバオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)阻害剤、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(trichothecene)を含む、酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートされたここに記載された抗体を含む。 40

【0191】

10

20

30

40

50

他の実施態様では、免疫コンジュゲートは放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートされるここに記載の抗体を含む。様々な放射性同位元素が放射性コンジュゲートの生産のために利用可能である。例は、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位元素を含む。放射性コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば Tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージング、 mri としても知られている)用のスピニ標識、例えばまたヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含みうる。

【0192】

抗体と細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPPD)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(ITT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCl)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスマジド化合物(例えば、ビス(p -アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p -ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアノトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MXTTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照のこと。リンカーは細胞中の細胞傷害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」でありうる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, *Cancer Research*, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

10

20

30

40

50

【0193】

ここでの免疫コンジュゲート又はADCは、限定するものではないが、(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.より)市販されているBMPs、EMCs、GMBs、HBVs、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAb、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCs、スルホ-GMBs、スルホ-KMUs、スルホ-MBs、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)を含む架橋剤を用いて調製されるコンジュゲートが明示的に考えられる。

【0194】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある実施態様では、ここに提供される何れかの抗FGFR4抗体は、生物学的サンプル中におけるFGFR4の存在の検出に有用である。「検出」なる用語は、ここで使用される場合、定量的又は定性的検出を包含する。ある実施態様では、生物学的サンプルは、細胞又は組織、例えば乳房、膵臓、食道、肺及び/又は脳を含む。

一実施態様では、診断又は検出の方法における使用のための抗FGFR4抗体が提供される。更なる態様では、生物学的サンプル中におけるFGFR4の存在の検出の方法が提供される。ある実施態様では、方法は、FGFR4への抗FGFR4抗体の結合が可能な条件下で生物学的サンプルをここに記載の抗FGFR4抗体と接触させる工程、複合体が抗FGFR4抗体及びFGFR4間で形成されているかを検出する工程を含む。一実施態様では、抗FGFR4抗体は、抗FGFR4抗体による治療に適格である被験体を選択するために、例えばFGFR4が患者の選択のバイオマーカーである場合に、使用される。

発明の抗体を使用して診断されうる例示的な障害は、癌(例えば乳房、肺、膵臓、脳、腎臓、卵巣、胃、白血病、子宮内膜、結腸、前立腺、下垂体、乳房線維腺腫、頭頸部、軟

部組織、神経芽細胞腫、メラノーマ、子宮内膜、精巣、胆管細胞癌、胆嚢及び肝臓の癌)を含む。

ある実施態様では、標識化抗 F G F R 4 抗体が提供される。標識は、限定するものではないが、直接検出される標識又は部分(例えば蛍光、発色団、高電子密度、化学発光、及び放射性標識)、並びに例えば酵素反応又は分子相互作用を通して間接的に検出される酵素又はリガンドなどの部分を含む。例示的な標識は、限定するものではないが、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許番号4、737、456)、ルシフェリン、2、3-ジヒドロタルアジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素、複素環オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、(HRP等の色素前駆体を酸化するために過酸化水素を伴う酵素にカップリングされる)、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビシン、スピノ標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカルなどを含む。

10

【0195】

F. 薬学的製剤

ここに記載される抗 F G F R 4 抗体の薬学的製剤は、所望の純度を有するこのような抗体を一又は複数の任意の薬学的に許容可能な担体と混合することによって凍結乾燥製剤又は水溶液の形態において調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A.編(1980))。薬学的に許容可能な担体は一般的に、用いられる用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)及び/又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。ここでの例示的な薬学的に許容可能な担体は、insterstitial drug分散剤、例えば可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrHuPH20(HYLENEX(登録商標, Baxter International, Inc.)を含む。特定の例示的なsHASEGP及びその使用は、rHuPH20を含み、米国特許公開番号2005/0260186及び2006/0104968に記載されている。一態様では、sHASEGPは一又は複数のグリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと組み合わせられる。

20

30

40

50

例示的な凍結乾燥抗体製剤は米国特許番号6,267,958に記載されている。水性抗体製剤は米国特許番号6,171,586及びWO2006/044908に記載されるものを含み、後者の製剤はヒスチジンアセテートバッファーを含む。

【0196】

ここでの製剤はまた、治療されている特定の徵候の必要に応じて2以上の活性成分を含み得、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものである。例えば、EGFRアンタゴニスト(例えばエルロチニブ)、抗血管新生剤(例えばVEGFアンタゴニスト、例えば抗VEGF抗体)又は化学療法剤(例えばタキソイド又は白金剤)を更に提供

50

することが望まれうる。このような活性成分は、意図される目的に有効な量において組合せで適切に存在する。

【0197】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術又は界面重合により調製したマイクロカプセル、例えば、それぞれコロイド状ドラッグデリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマイクロエマルジョンの、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に捕捉することもできる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

10

【0198】

徐放製剤を調製してもよい。徐放製剤の好適な例は、抗体を含む固形疎水性ポリマーの半透過性基質を含み、該基質は、成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形である。徐放性基質の例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えばLUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

インビボ投与に使用される製剤は一般的に無菌である。無菌性は、例えば滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成されうる。

20

【0199】

G. 治療方法及び組成物

ここに提供される抗FGFR4抗体の何れかは治療方法において使用されうる。一態様では、医薬としての使用のための抗FGFR4抗体が提供される。更なる態様では、癌の治療における使用のための抗FGFR4抗体が提供される。更なる実施態様では、肝疾患(例えば硬変)の治療における使用のための抗FGFR4抗体が提供される。更なる実施態様では、消耗性障害の治療における使用のための抗FGFR4抗体が提供される。ある実施態様では、治療の方法における使用のための抗FGFR4抗体が提供される。ある実施態様では、発明は、個体に有効量の抗FGFR4抗体を投与することを含んでなる、癌を有する個体の治療方法における使用のための抗FGFR4抗体を提供する。ある実施態様では、発明は、個体に有効量の抗FGFR4抗体を投与することを含んでなる、肝障害(例えば硬変)を有する個体の治療方法における使用のための抗FGFR4抗体を提供する。一つのこの実施態様では、方法は、個体に有効量の少なくとも1つの更なる治療剤、例えば下記のものを投与することを更に含む。更なる実施態様では、発明は、細胞増殖の阻害における使用のための抗FGFR4抗体を提供する。ある実施態様では、発明は、細胞増殖を阻害するために有効量の抗FGFR4抗体を個体に投与することを含んでなる、個体における細胞増殖を阻害する方法における使用のための抗FGFR4抗体を提供する。上記実施態様の何れかによる「個体」は、好ましくはヒトである。

30

【0200】

更なる態様では、発明は医薬の製造又は調製における抗FGFR4抗体の使用を提供する。一実施態様では、医薬は癌の治療のためである。更なる実施態様では、医薬は、癌を有する個体に有効量の医薬を投与することを含んでなる癌の治療方法における使用のためである。一実施態様では、医薬は肝障害(例えば硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患、胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症)の治療のためである。更なる実施態様では、医薬は、有効量の医薬を肝障害を有する個体に投与することを含んでなる肝障害(例えば硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患、胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症)の治療方法における使用のためである。一つのこの実施態様では、方法は、個体に有効量の少なくとも一つの更なる治療剤、例えば下記のものを投与することを更に含む。更なる実施態様では、医薬は細胞増殖を阻害するためであ

40

50

る。更なる実施態様では、医薬は、細胞増殖を阻害するために有効量の医薬を個体に投与することを含んでなる、個体における細胞増殖を阻害する方法における使用のためである。上記実施態様の何れかによる「個体」はヒトでありうる。

【0201】

更なる態様では、発明は、癌を治療するための方法を提供する。一実施態様では、方法は、このような癌を有する個体に有効量の抗FGFR4抗体を投与することを含む。一つのこのような実施態様では、方法は、個体に有効量の少なくとも一つの更なる治療剤、例えば下記のものを投与することを更に含む。上記実施態様の何れかによる「個体」はヒトでありうる。

【0202】

更なる態様では、発明は、肝障害(例えば硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患、胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症)を治療するための方法を提供する。一実施態様では、方法は、このような肝障害を有する個体に有効量の抗FGFR4抗体を投与することを含む。一つのこのような実施態様では、方法は、個体に有効量の少なくとも一つの更なる治療剤、例えば下記のものを投与することを更に含む。上記実施態様の何れかによる「個体」はヒトでありうる。

【0203】

更なる態様では、発明は、消耗性障害を治療するための方法を提供する。一実施態様では、方法は、このような消耗性障害を有する個体に有効量の抗FGFR4抗体を投与することを含む。一つのこのような実施態様では、方法は、個体に有効量の少なくとも一つの更なる治療剤、例えば下記のものを投与することを更に含む。上記実施態様の何れかによる「個体」はヒトでありうる。

10

【0204】

更なる態様では、発明は個体における細胞増殖を阻害するための方法を提供する。一実施態様では、方法は、細胞増殖を阻害するために個体に有効量の抗FGFR4抗体を投与することを含む。一実施態様では、「個体」はヒトである。

20

【0205】

更なる態様では、発明は、例えば上記治療方法の何れかにおける使用のための、ここに提供される抗FGFR4抗体の何れかを含んでなる薬学的製剤を提供する。一実施態様では、薬学的製剤は、ここに提供される抗FGFR4抗体の何れか及び薬学的に許容可能な担体を含む。別の実施態様では、薬学的製剤は、ここに提供される抗FGFR4抗体の何れか及び少なくとも一つの更なる治療剤、例えば下記のものを含む。

30

【0206】

発明の抗体は治療において、単独で又は他の薬剤との組合せにおいて使用されうる。例えば、発明の抗体は少なくとも一つの更なる治療剤と共に投与されうる。ある実施態様では、更なる治療剤は化学療法剤である。ある実施態様では、更なる治療剤は抗血管新生剤である。

【0207】

この種の複合治療は上記が、別々の管理及び、合同の管理(2つ以上の治療薬が同じであるか別々の製剤に含まれる所で)を含む点に注意した。その場合には、同時に、本発明の抗体の管理はあとに続いている及び/又は、付加的な治療薬の管理および/またはアジュvantの前に起こることができる。本発明の抗体が、また、放射線療法と結合して用いられることができる。

40

【0208】

本発明(いかなる付加的な治療薬及びも)の抗体はいかなる適當手段にもよって投与されることができる。そして、非経口投与薬を含む。そして、必要に応じて局所療法(病巣内管理)のための鼻くう(及び)及び、肺内である。非経口的注入は、筋肉内であるか、静脈内であるか、動脈内であるか、腹腔内であるか、皮下の管理を含む。例えば管理が簡単であるか慢性的かどうか一つにはに依存して、注射(例えば静脈内であるか皮下の注射)、投薬が、いかなる適切なルートにもよってあることができる。さまざまな時間-位置、食物塊

50

管理およびパルス注入の上の一つであるか多数の経営陣を含むがこれに限らずさまざまな投薬スケジュールは、本願明細書において考察される。

【0209】

本発明の抗体は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の抗体の量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1～99%で、或いは経験的/臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

10

【0210】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の好適な用量は(単独で用いる場合、又は一又は複数の他の付加的な治療剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体は一時的又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約1μg/kg～15mg/kg(例えば0.1mg/kg～10mg/kg)の抗体を、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができます。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約1μg/kg～100mg/kg以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2～約20、例えば約6用量の抗体が投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

20

【0211】

上記製剤又は治療方法の何れも、抗FGFR4抗体の代わりに又は加えて発明のイムノコンジュゲートを使用して実施されてもよいことが理解される。

30

【0212】

H. 製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、症状を治療、予防及び/又は診断するために有効な組成物単独又は他の組成物と組み合わせる組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグであります)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が選択された症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、(a)本発明の抗体を含有する組成物を中に収容する第一の容器；と(b)更なる細胞障害剤又はそれ以外の治療薬を含有する組成物を中に収容する第二の容器とを含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、組成物を特定の症状の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含む。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(BWF1)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

40

【0213】

50

上記製造品の何れも、抗FGFR4抗体の代わりに又は加えて発明のイムノコンジュゲートを含んでいてもよいことが理解される。

【0214】

I I I . 実施例

A . 抗FGFR4抗体での治療は肝細胞癌を阻害する

材料及び方法

インシリコ発現分析。発現分析では、箱ひげプロットをBioExpressTMデータベース(Gene Logic, Gaithersburg, MD)から抽出した正規化遺伝子発現データを用いてFGFR4について生成した。正常及び癌組織におけるFGFR4発現の分布をプローブ204579_atに伴うシグナルを使用して評価した。

10

【0215】

免疫組織化学。ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片をTrilogy (Cell Marque, Rocklin, CA)を使用して抗原回復のために処理し、次いで10 μg/ml 抗FGFR4抗体 (8G11; Genentech, South San Francisco, CA)でインキュベートした。免疫染色をビオチン化二次抗体、ABC-HRP試薬(Vector Laboratories, Burlingame, CA)、及び金属増感DAB比色ペルオキシダーゼ基質(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)を使用して達成した。

【0216】

半定量的RT-PCR。全RNAをRNeasyキット(Qiagen, Valencia, CA)を使用して抽出した。特異的プライマー及び蛍光発生プローブを使用し、遺伝子発現を增幅し定量化した。遺伝子特異的シグナルをRPL19ハウスキーピング遺伝子に正規化した。全てのTaqMan qRT-PCR試薬をApplied Biosystems (Foster City, CA)から購入した。最小限の三つ組セットのデータを各条件について分析した。データを平均 ± SEMとして示す。

20

【0217】

免疫沈降及び免疫プロット。培養細胞又は凍結組織の溶解物をコンプリートEDTA-フリーPROテアーゼインヒビター/カクテル(Roche, Indianapolis, IN)、ホスファターゼインヒビター/カクテル1及び2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、2 mMフッ化ナトリウム、及び2 mMオルトバナジウム酸ナトリウムで補充されたRIPA溶解バッファー(Millipore, Billerica, MA)で調製した。等量のタンパク質がBCAアッセイ(Thermo Fisher Scientific)によって決定され、FGFR4 (8G11; Genentech)、FGFR3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、FGFR2 (GeneTex, Irvine, CA)及びFGFR1 (Santa Cruz Biotechnology)に対する抗体を使用して免疫プロット分析によって分析した。ヒト肝臓溶解物では、免疫プロット分析を前述のようにFGFR4の免疫沈降によって実施した。

30

【0218】

FGFR4モノクローナル抗体の生成。FGFR4ヌルマウスを組換えヒト及びマウスFGFR4-Fcキメラタンパク質(Genentech)で免疫化した。脾臓を8週間に収集し、ハイブリドーマを生成した。培養上清を集め、免疫原に対して固相抗体結合アッセイによってスクリーニングした。陽性細胞株を、ヒト及びマウス FGFR4に対するFGF1及びFGF19結合を阻害する有効性について固相受容体結合アッセイを使用して更にスクリーニングした。

30

【0219】

LD1の分子クローニング。全RNAをRNeasy Mini kit (Qiagen)を使用してmULD1を生産するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽及び可変重ドメインを逆転写-PCR (RT-PCR)を使用して増幅した。順方向プライマーは可変軽及び可変重領域のNH₂-末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ軽鎖及び重鎖逆方向プライマーを、種にわたって高度に保存されている定常軽及び定常重ドメイン1における領域にアニールするように設計した。増幅された可変軽鎖をヒト 定常ドメインを有する哺乳類発現ベクターにクローニングした。増幅可変重鎖を完全長ヒトIgG1定常ドメインをコードする哺乳類発現ベクターに挿入した。キメラ抗体を前述のように一過性に発現させた。実施例(図1-9を含む)のこのパートAに記載される実験はキメラLD1を使用した。

40

【0220】

固相抗体結合アッセイ。Maxisorp96ウェルプレートを50 μlの2 μg/ml 抗ヒト免疫グ

50

ロブリンFc断片特異的(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)又は抗FLAG抗体(Sigma-Aldrich)で4°Cで一晩コートした。非特異的結合部位を1時間200 μl PBS/3%ウシ血清アルブミン(BSA)で飽和させ、FGFRs-IgG (Genentech and R&D Systems, Minneapolis, MN)又はFLAGタグ-FGFR4 (FGFR4 TM-FLAG)を1時間、PBS/0.3% BSAにおいてインキュベートした。プレート洗浄し、PBS/0.3% BSAにおいて抗FGFR4抗体で1時間インキュベートした。結合抗体をHRP-コンジュゲート抗IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)及びTMBペルオキシダーゼ発色基質(KPL, Gaithersburg, MD)を使用して検出した。

【0221】

フローサイトメトリー分析。フローサイトメトリー分析のための細胞を5mMのEDTAを含有するPBSで再懸濁させ、2%熱失活ウシ胎仔血清(FBS)を含有するPBSで洗浄した。続く全ての工程を氷上で実施した。細胞 (1x10⁶)を30分間一次抗体(LD1又はアイソタイプコントロール)でインキュベートし、その後、フィコエリトリン(PE)-コンジュゲート抗ヒトIgG抗体(Jackson ImmunoResearch)でインキュベーションした。細胞をFACScanフローサイトメーター(BD Biosciences, San Jose, CA)で分析した。

10

【0222】

DNAコンストラクト。ヒトFGFR4 (hFGFR4) cDNAを前述のようにクローン化した。FGFR4の細胞外ドメインをまた発現ベクター pCMV-Tag4A (Stratagene, La Jolla, CA)にサブクローニングし、C-末端でのFLAGタグ(FGFR4DTM-Flag)でFGFR4の分泌形態を得た。一塩基変異をQuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を使用してFGFR4DTM-Flagコンストラクトに導入した。我々はまた、ヒトFGFR1の細胞質ドメイン(FGFR1のアミノ酸残基K398 - R820)に融合されたヒトFGFR4の細胞外及び膜貫通ドメイン(アミノ酸残基M1-G392 of FGFR4)を有するヒトFGFR4-FGFR1キメラコンストラクト(hFGFR4/R1)を生成した。FGFR4 (太線)をFGFR1 (プレイン)に連結したアミノ酸配列は・・・AVLLLLLAGLYRGKMKSG・(配列番号: 32)・・である。hFGFR4 cDNA又はhFGFR4/R1 cDNAをpQCXIPレトロウイルスバイシストロニック発現ベクター (Clontech Laboratories, Mountain View, CA)にライゲートした。

20

【0223】

FGFR4DTM-Flag-条件培地。HEK293細胞を野生型又は変異体FGFR4DTM-Flagコンストラクト又は対応するエンプティベクターでトランスフェクトし、72~96時間、無血清PS25培地において維持した。得られた培地を濾過し、HEPES pH 7.2 (最終濃度40mM)及びプロテアーゼインヒビターを補充し、使用まで4°Cで保管した。

30

【0224】

細胞培養及び安定細胞株。HEK293、HEPG2、及びHEP3B細胞をAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)から入手し、10% FBS及び2 mM L-グルタミンで補充されたF-12:DMEM mix (50:50)において維持した。HUH7及びPLC/PRF/5細胞をDMEM高グルコース、10% FBSにおいて培養した。JHH4、JHH5、及びJHH7細胞をJapanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan)から購入し、10% FBS及び2 mM L-グルタミンで補充されたWilliams Medium Eにおいて維持した。SNU449細胞をATCCを入手し、10% FBS及び2 mM L-グルタミンを含有するRPMI 1640において維持した。BaF3細胞を10% FBS、1 ng/ml IL-3、及び2 mM L-グルタミンで補充されたRPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA)において維持した。L6細胞をATCCから入手し、10% FBSで補充されたDMEM高グルコースにおいて維持した。BaF3及びL6細胞の培養物を製造者の指示に従ってエンプティ、hFGFR4、又はhFGFR4/R1レトロウイルス発現ベクターで感染させ、10~12間、2.5 μg/mLピューロマイシン(Life Technologies)を含有する培地において選択した。選択したプールから、5 thパーセンタイルの最も高く発現する細胞を抗FGFR4抗体(8G11; Genentech)を使用してFluorescence Activated Cell Sorting (FACS)で単離した。高レベルのFGFR4、高レベルのFGFR4/R1を発現する細胞、及びエンプティベクターで安定にトランスフェクトされたコントロール細胞の得られたプールを、2.5 μg/mLピューロマイシンを含有する完全培地において維持した。

40

【0225】

50

分裂促進アッセイ。BaF3/コントロール、BaF3/FGFR4、及びBaF3/FGFR4/R1細胞を2回洗浄し、10% FBS、2 mM L-グルタミン、及び2 μ g/mlヘパリンで補充されたRPMI 1640において96-ウェルプレート(22,500細胞/ウェル)に播種した。FGFを各ウェルに加え、細胞を72時間、37 °Cでインキュベートした。相対細胞密度を製造者の指示に従ってCellTiter-Glo (Promega, Madison, WI)を使用して測定した。

【0226】

FGF経路活性化の抗FGFR4抗体阻害。細胞をLD1又はアイソタイプコントロール抗体の有無において24時間血清飢餓にした。次いでそれらを5 ng/ml FGF1 (FGF acidic, R&D Systems)及び10 μ g/mlヘパリンで5分間刺激した。細胞を、コンプリートEDTA-フリープロテアーゼインヒビターカクテル(Roche)、ホスファターゼインヒビターカクテル1及び2 (Sigma-Aldrich)、2 mM フッ化ナトリウム、及び2 mM オルトバナジウム酸ナトリウムで補充されたRIPA溶解バッファー(Millipore)で溶解させた。等量のタンパク質をホスホ-ERK1/2、ホスホ-FRS2、ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、及びFRS2 (Millipore)に対する抗体を使用して免疫プロットで分析した。

【0227】

クローン形成アッセイ。HUH7 (5,000細胞/well)、PLC/PRF/5 (2,000細胞/ウェル)、JHH5 (500細胞/ウェル)、又はJHH5/hFGFR4 shRNA (500細胞/ウェル)細胞を、三つ組において6ウェルプレートにおいて2 ml培地/ウェルにおいて播種した。播種の3時間後、HUH7及びPLC/PRF/5細胞を抗FGFR4抗体(chLD1; Genentech)の有無で処理した。抗体を実験の間(14日)週に2回かえた。JHH5及びJHH5/hFGFR4 shRNA細胞では、2 mg/mlドキシサイクリンの有無での処理を播種の3時間後に開始し、実験の間週に3回かえた。細胞をPBSで洗浄し、0.5%クリスタルバイオレット溶液で染色した。コロニーをMetaMorphソフトウェア(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を使用してカウントした。

【0228】

インビオ実験。全動物のプロトコルはInstitutional Animal Care and Use Committeeに承認された。年齢5~6週である雌nu/nuマウスをCharles River Laboratories International (Wilmington, MA)から得た。マウスは、餌が注射の12時間まで自由に標準的な餌及び水を与えられた。マウスは腹腔内(IP)注射(10 mg/kg)のコントロール又は抗FGFR4 (chLD1)抗体を与えられた。18時間後、マウスはビヒクリ(PBS)又は1mg/kg FGF19静脈内(IV)を受けた。30分後、全グループからのマウスは剖検され、組織サンプルが収集され、液体窒素において凍結され、-70°Cに保管した。凍結組織からの全RNAをRNeasyキット(Qiagen)を使用して調製した。3~5匹の動物のグループを各条件について分析した。データを平均±SEMとして表し、スチューデントt検定によって分析した。

【0229】

異種移植実験では、年齢6~8週のnu/nuの雌マウス (Charles River Laboratories International)を 5×10^6 細胞 (200ul/マウス)及びMatrigel (BD Biosciences)で皮下に播種した。7日後、等量(~150mm³)の腫瘍を有するマウスをグループ(n=10)にランダム化し、週に2回IPで処置した。腫瘍を電子キャリパー(Fowler Sylvac Ultra-Cal Mark III; Fred V. Fowler Company, Newton, MA)で測定し、腫瘍体積を式:(W² x L)/2を使用して算出し、ここでW及びLはそれぞれ小直径及び大直径である。データを平均腫瘍体積±SEMとして表し、スチューデントt検定によって分析した。

【0230】

FGF19トランスジェニックマウスを前述のように生産した。FGFR4ヌル変異体(FGFR4-KO)動物は前に方向したように構築され、Material Transfer Agreement (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX)のもと、W. L. McKeehanによって提供された。FGF19を過剰発現し、且つFGFR4受容体を欠くマウス(FGF19-TG:FGFR4-KO)を、ヤングアダルトFGF19-TGの雄とヤングアダルトFGFR4-KOの雌とを交配させることによって作った。双方の遺伝子工学イベントの存在をテイルDNAについてPCRによって離乳時に確認した。

【0231】

10

20

30

40

50

結果

FGFR4は、FGF19トランスジェニック・マウスの肝臓癌形成に、有用である。トランスジェニック・マウスのFGF19の外因の表示は、以前、10ヵ月歳までにHCCが生じることを示した(18)。FGFR4がこのFGF19によって媒介される腫瘍形成に関係しているかどうか判断するために、我々は、FGF19をFGFR4ノックアウト(FGFR4-KO)マウスまたはFGFR4野生型(FGFR4-WT)マウスを有するトランスジェニック(FGF19-TG)マウスに育てた。肝臓発癌が組織の総及びを実行することによって評価された及び、マウスはさまざまな時間位置で検死を行われた。新生物発生前の肝細胞性の増殖(すなわちBrdU編入)を測定することによる及び検査(18)。FGF19-TGのHCCの発現: FGFR4-WTマウスは、先に述べたものとしていた。FGF19-TGに対する反対: FGFR4-WTマウス(FGF19-TG): FGFR4-KOマウスは、この実験(図1A)の間に、いつでも肝細胞性の新形成の著しいか組織の証拠を進展させなかった。また、新生物発生前の肝細胞性の増殖は、FGFR4-WT遺伝子型を有したFGF19-TGマウスにおいてかなり上昇したが、FGF19-TGに明らかでなかった: FGFR4-KO腹子(図1B)。雌のFGF19-TGマウスの腫瘍開発のひどさ及び前に報告されたより高い頻度と整合した(18)、BrdU編入は、FGF19-TGにおいて増加した: 対応する男性(図1Bの左右のパネルを比較する)と比較したFGFR4-WT女性。我々も、FGF19-TGマウスのHCCの発現上のジエチル・ニトロソアミン(DEN)(有力な肝臓発癌物質)の効果を評価した。DENの管理は、FGF19-TGのHCCの発現を加速した: FGFR4-WTマウス。新生物発生前で腫瘍性の病変 变えられた(塩基親和の)肝の焦点、中心周囲の肝細胞形成異常症、よく区別された肝細胞性の腫瘍および積極的な肝細胞癌 の全ての範囲は、全てのDEN-既治療FGF19-TGから、肝臓に示した: 非DEN既治療FGF19-TGの10ヵ月の年齢と比較した4ヵ月の年齢(図1D)までのFGFR4-WT動物: FGFR4-WTマウス。ほとんどすべてのFGF19-TGからの肝臓の基本的な形態学の特徴: 全ての時間位置のFGFR4-WTマウスは、多数の葉(図1C)上のHCCのはなはだしく明白な小結節であった。腫瘍の負担は、肝臓重量を計量することによって評価された。FGF19-TGの全ての時間位置で、次第に増加する相対的な肝臓重量: DEN(図1E)を有するFGFR4-WTマウス既治療。面白いことに、肝臓重量の増加は、女性(6ヵ月の2.7倍)において、男性(6ヵ月の1.8倍)(図1Eの左右のパネルを比較する)においてより発音された。男性の誰も過去6ヵ月の年齢(図1E)を生き残らなかった点に留意する必要がある。肝臓癌形成はFGF19-TGにおいて述べた: DENを有するFGFR4-WTマウス既治療はFGFR4-KOマウスのFGFR4表現の除去によって廃止された。したがって、FGF19-TGの相対的な肝臓重量: FGFR4-KOマウスは、成人期(図1F)の間に一定のままだった。これらの結果は、FGFR4表現がマウスのFGF19を促進された肝臓癌形成のために必要なことを示唆する。

【0232】

抗-FGFR4中和モノクローナル抗体の生成。ターゲッティングFGFR4がHCCの治療的な影響を有することができたかどうか評価するために、我々は、人間のFGFR4及び組み換えマウスをもつFGFR4-KOマウスに予防接種をすることによって、FGFR4に特有の単クローナル抗体を生成した。結果として生じるクローナー(LD1に指定される)のうちの1台は、マウス、カニクイザルおよび人間のFGFR4(図2A)にその締め具の特異性のために選ばれた。この抗体は、マウスまたは人間FGFR1、FGFR2またはFGFR3(図2A)と結合しなかった。表面プラスモン共鳴分析で、相当する親和性(図2B)を有するマウス、カニクイザルおよび人間のFGFR4行きのそのLD1がみられた。我々は、FGFR4行きのLD1が細胞表面で現れるかどうか評価するために、フローサイトメトリを使用した。LD1を人間のFGFR4によって安定してトランスフェクションするHEK293細胞に具体的に結合することは、加えられる(図2C)抗体量と比例していた。LD1の締め具が、空のベクトルによって安定してトランスフェクションするHEK293電池を制御するためになかった。一緒に、これらのデータは、細胞表面で表されるときに、LD1が特にマウス、カニクイザルおよび人間のFGFR4と結合して、更に人間の受容体を認識することを証明する。

【0233】

LD1のためのFGFR4エピトープをマップするために、我々は、人間のFGFR1、FGFR2、FGFR3およびFGFR4及びマウスのアミノ酸配列を比較した。8つのアミノ酸は、FGFR1-3オルト・

10

20

30

40

50

ログのそれらの差違及び、FGFR4オルト・ログとのそれらの類似点に基づいて選ばれた。FGFR4のこれらのアミノ酸は、人間のFGFR4の8つの異なる変異体構造物を生成するために、FGFR3の等価な位置に存在するアミノ酸によって置換された。これらの構造物は、表されて、固相結合実験を使用することを結合しているLD1のために評価された。LD1は、大部分の変異体構造物及び等しくよく野生型FGFR4と結合した;G165Aは、結合しているLD1が危うくされた(図2D)唯一のFGFR4変異体であった。LD1は、陰性対照野生型FGFR3(図2D)と、結合しなかった。我々も、LD1をイムノプロット分析を使用している変異体構造物に結合することを試験した。全ての先に述べたタンパク質構造物は、減少して、変性して、電気泳動にかけられて、ニトロセルロースにelectro-transferredされた。ニトロセルロース膜はLD1によって順次暖められた。そして、抗-FGFR4抗体が異なるエピトープ(8G11)または抗-FLAG抗体を認識した。LD1がG165A変異体(図2E)を除いて等しくよく全ての構造物を検出すると共に、8G11及び抗-FLAG抗体は全てのFGFR4変異体構造物及び野生型FGFR4を検出した。タンパク質バンドは、管制レーン(図2E)の抗体の何れかによって検出されなかった。我々は、G165(図2F)の位置を視覚化するためにFGF19の2つの分子に結合されるFGFR4ダイマーの三次元モデルを生成した。G165は、2台のFGFR4装置との接触の間際に、FGFR4-FG19複合体の中央に局所化される。一緒に、これらの結果は、G165が人間のFGFR4を有するLD1の相互作用のために決定的であることを示す。LD1を還元して変性するFGFR4にも結合することは、エピトープが三成分の確認に依存しないことを示唆する。

【0234】

次に、我々は、LD1がFGF1およびFGF19を固相受容体-結合実験を使用しているFGFR4に結合することをブロックすることができるかどうか検査した。結合しているFGFのLD1抑制は、服用に依存して、FGF19(図3A)のための0.003nM、0.102の±及びFGF1のための0.006nM、0.093の±のIC50に着いた。LD1が細胞表面で表されるFGFR4の機能を阻害することができたかどうか評価するために、我々は、最初に、それがFGFR1(BaF3/FGFR4/R1)の細胞内の領域及びFGFR4の細胞外の領域のためにコード化する空想的な構造物によって安定してトランスフェクションするBaF3ネズミ・プロB細胞系を利用した。何れかFGFRs.を表さない、野生型BaF3細胞系は、インターロイキン3(IL-3)である-依存している細胞系へパリン及びFGFによって刺激されるときに、FGFRsによってトランスフェクションするBaF3細胞はIL-3がない場合、増殖する。この構造物のトランスフェクションは、我々がBaF3細胞の成長を支えるためにFGFsをIL-3と置換することができた。5nM FGF1がある場合には、LD1は、5.4nM(図3B)、17.4の±のIC50を有するBaF3/FGFR4/R1細胞の激増を阻害した。

【0235】

我々も、FGFシグナリング上のLD1の効果を評価するためにFGFR4(L6/FGFR4)を表しているベクトルによって安定してトランスフェクションするL6ネズミ骨格筋細胞系を使用した。LD1が服用に依存する方法(図3C)のこれらの二次伝達物質のリガンドによって誘発されたリン酸化を阻害すると共に、FGF1およびヘパリンのFGFR経路を起動するL6/FGFR4細胞培養への追加は細胞外の信号を調整されたキナーゼ1/2(ERK1/2)及びFGFR基質2(FRS2)のリン酸化によってデモをした。面白いことに、LD1の追加も、これらの細胞(図3C)の全体のFRS2内容の増加を誘発した。

【0236】

我々がLD1を結合することを評価したフローサイトメトリを使用することは、HCC細胞系のサブセットの細胞表面で、FGFR4の表示を確認した。LD1は、JHH5細胞(図3D)及び、最も高くより小さい範囲でHUH7行きのPLC/PRF/5及びと結合した。制御抗体をこれらの細胞の表面に結合することは、ごくわずかだった(図3D)。さらにまた、BaF3細胞(それらがFGFR4を表さないので、陰性対照として使われた)の表面に対する制御抗体及びLD1を結合することは、また、ごくわずかだった(図3D)。

【0237】

LD1は、肝癌細胞系のFGFR4機能を阻害する。LD1の阻害力は、内因性のFGFR(すなわちFGFR1-4)表現(図7)の各種レベルを有する肝癌細胞系を使用して特徴づけられた。HEP3B細胞において、LD1がFRS2(図4A)のFGF19を刺激されたリン酸化を阻害すると共に、FGF19の追

10

20

30

40

50

加はERK1/2及びFRS2のリン酸化を起動させた。そして、L6/FGFR4細胞に対するその効果と同様だった。LD1は、しかしながら、ERK1/2(図4A)のリン酸化をこれといって変えなかつた。

【0238】

チトクロームP450 7 1(CYP7 1)の表示およびc-Fosは、肝細胞線のFGF19によって調整される(16, 22)。我々は、LD1がこのFGF19によって媒介される遺伝子変調を禁止することができるかどうか検査した。HEB3B細胞において、FGF19の追加は、81%(図4B)、CYP7 1の表示を減らした。LD1の追加は、CYP7 1(図4B)の基礎表示の67%を復元した。加算FGF19の非存在下で、LD1は、2倍(図4B)、CYP7 1表現を増やした。FGF19の追加がHUH7細胞のCYP7 1の表示に影響を及ぼさなかつたにもかかわらず、LD1の追加は、FGF19の存在または欠如の2.9-および3.5倍この遺伝子の表現度を増やして、それぞれHEP3B細胞(図8)に記載の類似した効果を有した。陰性対照抗体の追加は、HEP3BかHUH7細胞(8及び図4B、それぞれ)のCYP7 1の表示に、影響を及ぼさなかつた。面白いことに、LD1の追加は、HEP3BおよびHUH7細胞の外因的に加算FGFR4リガンドの非存在下で、CYP7 1表現のアップレギュレーションにつながる。これは、LD1が基礎活性がおそらくFGFR4リガンド・オートクリン/パラ分泌ループによって維持したFGFR4を阻害することを示す。

10

【0239】

更にFGFR4の基礎活性上のLD1の効果を評価するために、我々は、外因的に加算FGFR4リガンドの非存在下でc-Fosの表示を測定した。FGFR4経路の活性化は、以前、c-Fosの表示を増やすことを示した(16)。LD1の追加は、PLC/PRF/5つのセル線の75%、JHH5、JHH7およびHUH7細胞系及びの50%、c-Fosの基礎表示を減少させた;制御抗体の追加は、基礎c-Fos表現(図4C)に、影響を及ぼさなかつた。これらの結果は、FGFR4の基礎活性を阻害するために、LD1の能力を示す。

20

【0240】

LD1は、コロニー形成を阻害する。我々は、最初にコロニー形成をドキシサイクリン誘導性のFGFR4特定のshRNAまたは制御shRNAによって安定してトランスフェクションするJHH5細胞で測定した。非存在下でコロニーを形成するために制御構造物によってトランスフェクションするJHH5細胞の能力またはドキシサイクリンの存在の違いがなかつたにもかかわらず、ドキシサイクリンのshRNAが造るFGFR4によってトランスフェクションするJHH5細胞への追加はドキシサイクリン(図4D)の非存在下で細胞と比較して、76%コロニー形成を阻害した。この結果は、FGFR4が肝癌細胞系のコロニー形成に関係していることを示唆する。

30

【0241】

次に、我々は、肝癌細胞系のパネルによってコロニー形成を阻害するために、LD1の能力を試験した。LD1のJHH5、HUH7およびPLC/PRF/5セルの培養組織への追加は、26%、50%および82%の最大の抑制に達して、それぞれコロニー形成(図4F)の服用に依存する減少を引き起こした。HUH7細胞培養及びPLC/PRF/5の代表例は、図4Eに示される。制御抗体の追加は、コロニー形成(図4F及び4E)に影響を及ぼさなかつた。これらの結果は、LD1が肝癌細胞系のFGFR4によって媒介されるコロニー形成を阻害することを示す。

40

【0242】

LD1は、活発な活性のFGFR4を阻害する。我々は、LD1または制御抗体を注射されるマウスの肝臓のFGF19を起動するc-Fos誘導を測定することによって、LD1の生体内での有効性を評価した。肝臓のc-Fos誘導がFGF19刺激に影響されるので、我々はFGF19へのc-Fos反応をモニタするほうを選択した(16)。c-Fos表現は、53倍、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(図5A)を有するマウス既治療の肝臓と比較して、FGF19を有するマウス既治療の肝臓においてより高かった。LD1の管理は、18時間、FGF19の注射の前に、3.5倍(図5A)、c-Fos誘導を減らした。LD1も、6倍(図5A)、単純なマウスのc-Fos表現の基礎レベルを減らした。制御抗体の注入は、未処置のマウス(図5A)と比較して、c-Fosの基礎であるかFGF19を刺激された表示を変えなかつた。これらのデータは、FGF19を刺激されたFGFR4活性及び基礎ものを阻害することで、LD1の生体内での有効性を示す。

50

【 0 2 4 3 】

LD1は、生体内で腫瘍成長を阻害する。腫瘍成長を阻害することで、LD1の生体内での有効性を調べるために、我々は、最初にHUH7肝癌細胞系異種移植片モデルを利用した。定着腫瘍(ほぼ150のmm³)を支えているマウスは、30mg/kgのLD1、30mg/kgの制御抗体またはPBSを有する一回分を盛られた週刊誌であった。13日後に、PBSか制御抗体を有するマウス既治療のHUH7腫瘍は、720のmm³(図5B)の平均サイズに増大した。しかしながら、LD1を有するマウス既治療のHUH7腫瘍は、28のmm³、制御抗体と比較した腫瘍成長の96%の抑制またはPBS(図5B)の平均サイズに増大した。繰り返された実験において、二回週につき30mg/kgのLD1の管理によって、完全な腫瘍成長阻害(図9)が生じた。剖検で、FGFR4を調整された遺伝子及びFGFR4の表示上のLD1の効果が評価された及び、腫瘍は切除された。LD1の管理は、HUH7異種移植片腫瘍(図5C)のFGFR4表現に影響を及ぼさなかった。しかしながら、LD1は、PBS既治療マウス(図5C)の腫瘍において測定されるCYP7 1の発現レベルと比較して、3倍CYP7 1の表示を増やした。LD1も、PBS治療をうけているマウス(図5C)と比較して、17-および6倍、それぞれ、egr-1及びc-Fosの表示を減らした。

10

【 0 2 4 4 】

更にLD1の生体内での有効性を評価するために、我々は、FGF19-TGマウスモデルを使用した。FGF19-TGマウスは、腫瘍形成を加速するために15日の年齢でDENで扱われて、それから4週間目でランダムに3つの一団に分類された。その他の2つのグループがLD1か毎週の基礎上の抗-FGF19抗体(1A6)を受けた及び、1つのグループは制御抗体を受けた。1A6は、以前、FGF19-TGマウスの腫瘍形成を予防することを示した(23)。肝臓が分析のために切除された及び、6ヶ月後に、マウスは検死を行われた。制御抗体を有するマウス既治療の肝臓は、多数の葉(図5D)に、はなはだしく明白な大きな小結節があった。しかしながら、LD1(図5D)または1A6を有するマウス既治療の肝臓には、新形成の証拠がなかった。このパラメータが以前強くFGF19-TGモデルのパーセント腫瘍ボリュームと相關することを示したので、我々も腫瘍の負担を評価するために肝臓重量を計量した(18, 23)。LD1または1A6を有するマウス既治療からの肝臓の重量は、制御抗体(図5E)を有するマウス既治療から、肝臓の重量より有意に低かった($p = 0.035$ 及び $p = 0.052$ 、それぞれ)。LD1を有するマウス既治療および1A6を有するマウス既治療間の肝臓重量の違いは、重要でなかった(図5E)($p = 0.439$)。一緒に、これらのデータは、症状発現前のモデルの肝細胞癌を阻害することで、明らかにLD1の生体内での有効性を示す。

20

【 0 2 4 5 】

FGFR4表現は、癌において変えられる。我々は、BioExpressデータベース(遺伝子Logic、会社、Gaithersburg、MD、米国)を分析することによって、種々の人間の通常の及びガン組織のFGFR4表現を評価した。FGFR4表現は、大部分の種類の癌において非常に可変的である。正常組織と比較して、FGFR4表現は、肝臓において高架鉄道で、結腸直腸で、胃で、食道、小腸癌だった(図6A)及び、しかし、腎臓、肺、リンパ性において減弱して、及び精巣癌。免疫組織化学(IHC)を使用して、我々は、肺、胸部、脾臓、及び卵巣の腺癌、肺扁平上皮癌、肝細胞癌、甲状腺癌、及び正常はい、脾臓および甲状腺のサンプルのパネルのFGFR4を局所化した。FGFR4の検出は、通常で腫瘍性の上皮細胞(代表例は、図6Bに示される)の膜で細胞質の染色を引き起こした。正常組織と比較して、染色のより高い等級は、通常、腫瘍サンプルで見つかった。抗-FGFR4による著しい標識に適度な脾臓(41%の標本において)、胸部(46%)、肺(31%)、卵巣(41%)、コロン(90%)、肝臓(33%)および甲状腺(11%)(ref. 23及び表2)からの腫瘍において明らかだった。

30

【 0 2 4 6 】

表2：正常及び癌組織におけるFGFR4発現。FGFR4免疫染色の病理組織学的評価によって決定される正常及び癌組織におけるFGFR4発現の蔓延

40

	サンプルの数	グレード			
		0	1+	2+	3+
肺腺癌	29	7 (24%)	13 (45%)	7 (24%)	2 (7%)
肺扁平上皮癌	23	7 (30%)	15 (65%)	1 (4%)	0
乳腺腺癌	63	1 (2%)	33 (52%)	25 (40%)	4 (6%)
甲状腺癌	86	16 (19%)	60 (70%)	9 (10%)	1 (1%)
膵臓腺癌	67	4 (6%)	36 (54%)	24 (36%)	3 (5%)
卵巣腺癌	80	9 (11%)	38 (48%)	26 (32%)	7 (9%)
正常な肺	4	3 (75%)	1 (25%)	0	0
正常な甲状腺	9	2 (22%)	7 (78%)	0	0
正常な膵臓	23	2 (9%)	17 (74%)	3 (13%)	1 (4%)

【0247】

人間のHCCのFGFR4の広範囲にわたる表示は、また、以前 *in situ* ハイブリッド形成によって確認された(23)。HCC及びFGFR4の関連がすでに提案されたので、我々は定量的リアルタイムPCR法(qRT-PCR)を使用している11の正常肝及び更に23の主要な人間の肝腫瘍のFGFR4表現を評価することに決めた。各々のサンプルのFGFR4の表示は、第1の正常肝サンプル(N1)のこの受容体の表示に正常化された。FGFR4の平均レベルは正常肝(0.90 ± 0.04 -折り目)と比較して肝腫瘍(1.22 ± 0.05 -折り目)において適度に増加した、しかし、その人口が全体として考慮される(図6C)ときに、違いは統計的有意差($p = 0.23$)に着かなかつた。しかしながら、FGFR4表現は、腫瘍のサブセットが、かなりより高かった(2倍以上)($7/23; 30\%$)。これらの結果は、FGFR4表現が数種類の癌において規制撤廃されることを示す。肝腫瘍のサブセットのFGFR4の発現増加は、それが肝癌の治療の魅力的な目標を診断選択された患者集団において代表できることを示唆する。

【0248】

この研究において、抗体を機能させなくなっているFGFR4を有するその処理が抗腫瘍利点を提供することができる及び、我々はFGFR4が肝細胞癌に参加するという証拠を提供する。肝臓腫瘍形成のFGFR4の関与を評価するために、我々は、遺伝子工学によるマウスモデルを使用した。FGF19の外因の表示は、肝細胞増殖、肝細胞性の形成異常症およびマウスのHCCの発現を促進することを示した。加えて、我々その他は、Klotho がFGF19の肝臓-比活性のために必要なことを証明した(16, 19, 24)。FGFR4及びKLBが肝臓において最も高く表されるので、我々はFGFR4経路の規制緩和がFGF19によって媒介される肝臓腫瘍形成の原因となると仮定した。この仮説を検証するために、我々は、FGFR4-KOマウスを有するFGF19-TGマウスを育てた。肝細胞性の新形成及び新生物発生前の肝細胞性の増殖は、FGFR4-WT背景をもつFGF19-TGマウスだけで発見された。より生きている腫瘍形成は、FGFR4-KOマウスにおいて廃止された。我々は、有力な肝癌誘発物質(ジエチル・ニトロソアミン)を投与することによって、更にマウスに疑問を呈した。DENを有する処理はFGFR4-WT背景をもつFGF19-TGマウスのHCCの発現を加速したのに、肝臓新形成の証拠はFGFR4-KOマウスで発見されなかつた。はっきりした結論は、FGFR4がFGF19を促進された肝臓腫瘍形成のために必要であるということである。

10

20

30

40

50

【0249】

一緒に、これらのデータは、FGFR4、肝臓腫瘍形成および肝癌進行の関連を提案する。従って、その抑制が肝癌患者に治療的な利点を提供することができる及び、FGFR4は潜在的治療的な目標である。このために、我々は、抗-FGFR4中和抗体(LD1)を呈した。LD1は、FGFR4と結合して、生体外でリガンド締め具、経路活性化、遺伝子形質発現の調節、細胞増殖およびコロニー形成を阻害する。LD1がFGFR4と結合するサイトは、FGFR4オルト・ログの間で類似であるが、FGFR1-3オルト・ログにおいて異なるサイトでポイントミューションを支えているFGFR4構造物を有するLD1の相互作用を評価することによって局所化された;FGFR4のこれらのアミノ酸残基は、FGFR3の等価な位置に存在するアミノ酸残基によって置換された。LD1は、FGFR4がG165A変異体を除いて造る変異体の全て及び、野生型FGFR4と結合した。FGFR4の位置165のアラニンによるグリシンの置換は、ほとんど、結合しているLD1を廃止した。FGFRs間のこの領域の高いアイデンティティと結合されるFGFR4のためのLD1の洗練された特異性は、結合しているLD1のためのこの残りの重要性を強調する。FGFR4のグリシン165は、FGFR1のアラニン171に対応する。面白いことに、アラニン171は、FGFR1ダイマー・インタフェースで最も近い方法の残りである(25)。ダイマーの軸全体に、1つの受容体のアラニン171の側鎖は、隣接した受容体のアラニン171と恐怖病に連絡をとる。FGFRsのこの領域のシーケンスの保護は、受容体-受容体インタフェースを形成しているこの領域と整合している(26, 27)。このように、LD1をFGFRのこの等価な領域に結合することは、受容体二量体化を崩壊させてありそうである。リガンドによって誘発された受容体二量体化は、FGFRsの活性化にとって重要である。従って、FGFR4二量体化の抑制は、LD1のための潜在的作用機構である。類似した作用機構は、他の治療的な抗体のためにすでに記載されていた(28)。

10

20

30

40

【0250】

我々は、生体内で、LD1が遮断の腫瘍成長によってFGFR4及びの下流に遺伝子の変調を禁止することによって肝癌異種移植片腫瘍に従って行動することを示した。加えて、LD1の管理は、FGF19-TGマウスのHCCsの形成および開発を禁止した。

【0251】

これらのデータは、FGFR4が癌進行及び腫瘍形成を促進することに関係していることを証明する。特に、我々の結果は、FGFR4が肝細胞癌において重要な役割を果たすことができるることを示唆する。証拠のいくつかの境界は、この仮説をサポートする。FGFR4は、人間の肝細胞に存在する支配的なFGFRの等形である(15)。我々は肝臓組織がKLB反訳記録レベル及び最も高いFGFR4を有すると前に報告した。そして、その両方はこのシグナリング複合体によってリガンドを刺激された活性にとって重要である(16)。さらにまた、マウスのFGF19(すなわちFGFR4に特有のリガンド)の異所性の表示は、肝細胞増殖、肝細胞性の形成異常症および新形成を促進する(18)FGF19によって誘発された肝細胞及び、増殖は、FGFR4によって独自に調停されることが報告された(24)。最近の報告は、FGFR4もアルファ胎仔タンパク質分泌、増殖および抗-アポトーシスを調整することによって有意にHCC進行に関与することを示唆する(17)。FGFR4表現は、また、化学療法に対する抵抗を促進することを示した(29)。1つのグループがマウスのFGFR4のための保護役割(HCCプロモーティング作用よりむしろ)を報告した点に留意する必要がある(30)。リガンド、同じくFGFRsのレベルおよび共同受容体発現の集中及び識別を含む前後関係の要因が腫瘍形成のFGFR4の役割を調整するかもしれないかもしれない。例えば、我々はFGFR4表現が主要な肝腫瘍のサブセットにおいてかなり増加するとわかった。そして、FGFR4が肝癌の治療の魅力的な目標を診断選択された患者集団において代表できることを示唆した。HCC進行及び肝臓腫瘍形成のFGFR4の関与に対して蓄積している証拠を与えられて、我々は、抗-FGFR4中和抗体を含む治療的な介入が肝癌の治療において有益にしそうであると思っている。

【0252】

部分的参照リスト

1. Ornitz, D.M., and Itoh, N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3005.

50

2. Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149.
3. Powers, C.J., McLeskey, S.W., and Wellstein, A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7:165-197.
4. Bange, J., PrechtI, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., et al. 2002. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* 62:840-847.
5. Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P., and Radvanyi, F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23:18-20. 10
6. Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 2001. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 97:729-736.
7. Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16:260-264.
8. Gowardhan, B., Douglas, D.A., Mathers, M.E., McKie, A.B., McCracken, S.R., Robson, C.N., and Leung, H.Y. 2005. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer* 92:3 20-327. 20
9. Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P., and Nevanlinna, H. 1993. Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer* 54:378-382.
10. Jang, J.H., Shin, K.H., and Park, J.G. 2001. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 61:3541-3543.
11. Jang, J.H., Shin, K.H., Park, Y.J., Lee, R.J., McKeehan, W.L., and Park, J.G. 2000. Novel transcripts of fibroblast growth factor receptor 3 reveal aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in colorectal cancer. *Cancer Res* 60:4049-4052. 30
12. Jeffers, M., LaRochelle, W.J., and Lichenstein, H.S. 2002. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. *Expert Opin Ther Targets* 6:469-482.
13. Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J., and Fletcher, J.A. 1998. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat Genet* 18:84-87. 40
14. Shariff, M.I., Cox, I.J., Gomaa, A.I., Khan, S.A., Gedroyc, W., and Taylor-Robinson, S.D. 2009. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3:353-367.
15. Kan, M., Wu, X., Wang, F., and McKeehan, W.L. 1999. Specificity for fibroblast growth factors determined by heparan sulfate in a binary complex with the receptor kinase. *J Biol Chem* 274:15947-15952.
16. Lin, B.C., Wang, M., Blackmore, C., and Desnoyers, L.R. 2007. Liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta. *J Biol Chem* 282:27277-27284.
17. Ho, H.K., Pok, S., Streit, S., Ruhe, J.E., Hart, S., Lim, K.S., Loo, H.L., A 50

- ung, M.O., Lim, S.G., and Ullrich, A. 2009. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *J Hepatol* 50:118-127.
18. Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E., Hillan, K., Wright, B., Frantz, G. D., Pham, T.A., Dillard-Telm, L., Tsai, S.P., Stephan, J.P., et al. 2002. A mouse model of hepatocellular carcinoma : ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am J Pathol* 160:2295-2307.
19. Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A.V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Kliewer, S.A., and Kuro-o, M. 2007. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 282:26687-26695.
20. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K., and French, D.M. 2008. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res* 68:5086-5095.
21. Ornitz, D.M., Yayon, A., Flanagan, J.G., Svahn, C.M., Levi, E., and Leder, P. 1992. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 12:240-247.
22. Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang da, Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., et al. 2003. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 17:1581-1591.
23. Desnoyers, L.R., Pai, R., Ferrando, R.E., Hotzel, K., Le, T., Ross, J., Carano, R., D'Souza, A., Qing, J., Mohtashemi, I., et al. 2008. Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. *Oncogene* 27:85-97.
24. Wu, X., Ge, H., Gupte, J., Weiszmann, J., Shimamoto, G., Stevens, J., Hawkins, N., Lemon, B., Shen, W., Xu, J., et al. 2007. Co-receptor requirements for fibroblast growth factor-19 signaling. *J Biol Chem* 282:29069-29072.
25. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., and Mohammadi, M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98:641-650.
26. Ibrahimi, O.A., Yeh, B.K., Eliseenkova, A.V., Zhang, F., Olsen, S.K., Igarashi, M., Aaronson, S.A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M. 2005. Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization. *Mol Cell Biol* 25:671-684.
27. Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahimi, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
28. Agus, D.B., Akita, R.W., Fox, W.D., Lewis, G.D., Higgins, B., Pisacane, P.I., Lofgren, J.A., Tindell, C., Evans, D.P., Maiese, K., et al. 2002. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2:127-137.
29. Roidl, A., Berger, H.J., Kumar, S., Bange, J., Knyazev, P., and Ullrich, A. 2009. Resistance to chemotherapy is associated with fibroblast growth factor receptor 4 up-regulation. *Clin Cancer Res* 15:2058-2066.
30. Huang, X., Yang, C., Jin, C., Luo, Y., Wang, F., and McKeehan, W.L. 2009. Resident hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 limits hepatocarcinogenesis

s. Mol Carcinog 48:553-562.

31. Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., and Williams, P.M. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. Anal Biochem 270:41-49.

32. Tomlinson, E., Fu, L., John, L., Hultgren, B., Huang, X., Renz, M., Stephan, J.P., Tsai, S.P., Powell-Braxton, L., French, D., et al. 2002. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. Endocrinology 143:1741-1747.

33. Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.X., and McKeehan, W.L. 2000. Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. J Biol Chem 275:15482-15489.

【0253】

B. 的外れに非常に特定のFGF受容体4に対して抗体の人間化の間、除去される識別された及びを結合する

方法及び材料

FGFR4はSulfo-NHS-LC-ビオチンを使用してビオチン化された(入る;ネコ21335)。

キメラLD1の生成 - 本願明細書において記載されているように、人間のFGF受容体4(FGFR4)の細胞外の領域は、記載されているにつれて、及びが純化したCHO細胞を中で表したbalb/cマウスに予防接種をするために用いた。クローンがタンパク質ベースのELISAのFGFR4と結合しているFGF19を遮断する能力のために放送されるときに、LD1を表しているハイブリドーマは識別された。

【0254】

ネズミのLD1可変ドメインは、標準分析法を使用しているハイブリドーマ細胞を生じているLD1から抽出される完全リボゾームリボ核酸からクローンをつくられた。可変的な重い(VH)領域及び可変照明(VL)は、VH地方及びVLのN末端アミノ酸配列に特有の前方のプライマ及び恒常的な重い領域1(CH1)及び恒常的な光(CL)に変性復帰プライマを有するRT-PCRを使用して増幅された。これらの可変ドメインは、それから、H鎖恒常部及びそれぞれの人間の光を含んだベクトルへのクローンをつくられたin-frameであった。

【0255】

LD1の親和性成熟及びヒト化 - LD1のHypervariableな領域は、人間のVHサブグループIII(huIII)可変ドメイン・フレームワーク及び私(huKI)がtrastuzumabにおいて使用した人間のカッパに移植された。フレームワーク変化の最小限の組合せが識別された非常に完全に回復するFGFR4結合能であるまで、フレームワーク修理はマウス副尺位置の追加によるFGFR4結合能を最適化するために用いた。

【0256】

hLD1.vB(バクテリオファージ上の一価性のFab-P3融合として示される)は、柔らかい機会的分布戦略を使用して熟成する親和性であった。ネズミの高度変異部シーケンスへの偏りが毒入りのオリゴヌクレオチド合成戦略を使用して維持されたように、シーケンス多様性は別に各々の高度変異部にもたらされた。各々の多様化された位置のために、野生型アミノ酸をコード化しているコードンは、各々の位置で平均50パーセントの突然変異率に結果としてなっているヌクレオチドの70-10-10-10の混成によって有害にされた。

【0257】

hLD1.vB多様化されたバクテリオファージ・ライプラリは、可溶性の選択方法を使用してパンされた。この方法は溶液のビオチン化されたFGFR4の低い集中を有する短い結合期間に依存した。そして、固定された中性アビシン上のFGFR4にバクテリオファージ-跳躍の短い5分の捕獲が続いた。過剰なラベルのないFGFR4(100nMを超える)は、増加した外れた率選択厳しさのための捕獲ステップの前に加えられた。縛られたバクテリオファージは30分の間の100mMのHClを有する井戸を暖めることによって抜き取られた。そして、M13/K07

10

20

30

40

50

ヘルパー・ファージ及び1Mのトリス、pH 8および増幅された使用しているXL1-Blue電池で効力を消された。バクテリオ・ファージ抗体はノーカット免疫グロブリンGに再フォーマットされた。そして、一過性に哺乳動物細胞において表されて、Protein Aクロマトグラフィによって純化された。

【0258】

親和性の決定 - 親和性の決定は、BIAcoreTM-2000を使用している表面プラスモン共鳴によって実行された。

PBSTのFGFR4(0.48-1000nM)の連続2倍の希釈剤が30の μ l / 最小限度の流速で、注入された及び、hLD1.vB免疫グロブリンGのほぼ50のRUはCM5センサチップ上の10mMのSodium Acetate pH 4.8において固定された。各々のサンプルは、10分の解離及び4分の関連によって分析された。各々の注射の後、チップは、10mMのグリシンpH 1.7を使用して再生した。結合反応は、RUを類似した密度で固定される無関係な免疫グロブリンGを有する流れセルから減算することによって修正された。Langmuirがkoff及びkonの同時合わせることの中でモデル化する1:1が、キネティクス分析のために使われた。

【0259】

異種移植片実験 - 全動物プロトコルは、Genentech's Institutional Animal CareおよびUse委員会の承認を得た。7週間目の雌のnu/nu(裸の品種相似係数)マウスは、チャールズ川Laboratoriesインターナショナル(コード088の重圧となる)から得られた。マウスは、特定病原体感染防止条件状況の下で維持された。HUH7細胞(5つのx 106; 日本Health科学Research Resourcesバンク(ネコJCRB0403))HBSS/Matrigelの0.2mL量のマウスの横腹に、皮下に植設した(1:1にv/v; BD Biosciences(ネコ354234))。腫瘍ボリュームが公式を使用して算出された及び、腫瘍はカリパス副木で毎週二回測定された: $V = 0.5 \times L \times W^2$ (LおよびWが腫瘍の長さおよび幅である)、それぞれ。平均腫瘍ボリュームが145のmm³に着くときに、マウスは車両(PBS)、30mg/kgのchLD1、30mg/kgのhLD1.vBまたは30mg/kgのhLD1.v22の0.2mLの腹こう内投与によって1週間に1回既治療及びグループ($n = 15$)にランダム化された。処理後の、腫瘍体積は、上記の通りに計量された。パーセント腫瘍成長阻害(% TGI)は以下の公式を使用して算出された、制御車両のDay 21の平均腫瘍ボリュームはどのC =で試験処理を与えられる各々のグループのマウスからT =及びDay 21上の平均体積を分類する: 100が×印を付ける((CT)/C)%TGI =。ログランク検定がJMPソフトウェアをもつグループの腫瘍を2倍にしている違いを評価するために用いた及び、データが分析されて、Version 6.0(SAS研究所; ケアリー(NC))。データは、平均腫瘍ボリューム \pm SEMとして示される。

【0260】

マウスの薬物動態学的研究 - NCRヌードマウスは、Taconic(ネコNCRNU)によって供給された。C3ノックアウト・マウスは、少なくとも10世代のためのC57BL/6マウスに戻し交配された。子供たちは、野生型の統制及びC3ノックアウト・マウスを生産するために交差した。この研究において、それぞれ、それらは、C3 wtマウス及びC3 koと称する。

【0261】

15.5および38.3gの間で体重があっているマウスは、尾静脈を経て抗-FGFR4抗体の1、5または20mg/kgの体重点滴大量瞬時投与量を施された。選択された時間に分離される血清及び心臓棒(時間につきn=3マウスは、ポイントする)が最高28日のポスト服用を示す又は、血液サンプルはレトロ軌道裁切りを経て集められた。血清サンプルは、格納された-80°C ELISAを使用している抗-FGFR4抗体血清中濃度のために検定される。

【0262】

抗-FGFR4抗体血清中濃度-時間側面は、WinNonlin Enterprise Version 5.2.1(Pharsight社)を使用しているPKパラメータを推定するために用いた。単一の集中?時間側面が各々のグループのために決定されたので、各々のPKパラメータの発作の標準誤差(SE)とともに、各々のPKパラメータの1つの評価は得られて、報告される。各々のグループのために管理される名目服用が、モデリングのために使われた。

【0263】

10

20

30

40

50

放射性ヨウ素化 - 抗体は、間接的なヨード情報追加方法を使用して radioiodinated された。放射性同位元素で識別されたタンパク質は、NAP5TM柱を使用して精製された(GE Healthcare ライフ Sciences, cat. 17-0853-01) 予め PBSにおいて釣り合させられた。生体外実験において使用する分子の比活性は、hLD1.vB のための 15.05mCi/mg 及び chLD1 のための 14.38 mCi/mg であった。生体内での研究において使用する分子の比活性は、hLD1.vB のための 9.9 9mCi/mg 及び chLD1 のための 12.52mCi/mg であった。放射性ヨウ素化後の、 radioiodinated された、抗体は、ラベルのない抗体と結合している相当するテストを保持している完全な及びとして、サイズ排除高圧液体クロマトグラフィ(HPLC)、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)および E L I S A によって特徴づけられた。

10

【 0 2 6 4 】

インビトロインキュベーション - 200mg/ml の終濃度において血清において For 潜伏、抗体は、NCR 裸像(C3 ko または C3 wt マウス血清)に加えられた PBS + 0.5% 及び BSA アリクオット(100 の μ l) は、作られて、穏やかな回転を有する 37 °C で暖められた。サンプルは、及びが保存した 0、4、8、24、48 および 96h で、ドライアイスへ転送された - E L I S A 分析まで 70 °C。

【 0 2 6 5 】

プラズマの潜伏のために、抗体がカニクイザル(人間)に加えられたことネズミ(バイオ開発 LLC(ネコ))。CYNPLLIHP、HMLLIHP、そして、それぞれ、RATPLLIHP)、0.5% PBS + 及び NCR ヌードマウス・プラズマ(Taconic、ネコ NCRNU-E)及び 5 つの \times 106 の CPM/ml の終濃度の 20 0mg/ml の \pm 125I - 抗体の終濃度で BSA。アリクオット(100 の μ l) は、作られて、穏やかな回転を有する 37 °C で暖められた。0、24 および 48h でサンプルが及びが保存したドライアイスへ転送されたこと - サイズ - 除外 HPLC(ラベルのない抗体がサンプルをとる 125I - 抗体+) による分析まで 70 °C または SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ラベルのない抗体サンプル)が続くタンパク質-G 摘出を受ける。

20

【 0 2 6 6 】

組織分布試験 - 雌 NCR ヌードマウスは、20mg/kg で 300mCi/kg の \pm ラベルのない hLD1.vB で、20mg/kg または 125I - hLD1.vB で 300mCi/kg の \pm ラベルのない chLD1 で、125I - chLD1 の点滴大量瞬時投与量を受信した。血液は、2、5、24、72 および 120h のポスト服用及び 15 分に集められて、血清のために処理された。血清は、凍られた - サイズ - 除外 HPLC によって分析されるまで、タンパク質-G 摘出を受ける及びが SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分離によってあとに続いて 70 °C。総放射性カウントは、また、ウォーレス 1480 ウィザード 3" を使用して得られた(EC&G ウォーレス(ネコ)。1480-011)。肝臓(肺)心臓が 2、72 集められた及び腎臓凍られる 120 時間のポスト服用及び及び - 全体の放射能のための分析まで 70 °C。全ての動物は、IACUC ガイドラインに従って慣らされた。

30

【 0 2 6 7 】

IgG 及び FGFR4 ELISA - 特定の免疫グロブリン G 及び免疫グロブリン G は、FGFR4 E L I S A を使用して測定された。FGFR4 はミクロタイタープレートに固定されたと、捕獲免疫グロブリン G が 2 つのヤギ抗-hulgG Fc がワサビペルオキシダーゼ(HRP、ジャクソン、cat# 10 9-036 ~ 098) に接合した F(ab') によって検出された及び、0.35M の NaCl(1x PBS pH 7.4、0.5% の BSA、0.05% の Tween-20、0.25% の Chaps、5mM の EDTA、0.2% の BgG、0.35M の NaCl、15ppm の Proclin) がそうであった Magic Buffer + において希釈されるサンプル及び LD1 標準(chLD1、hLD1.vB または hLD1.v22) が付け加えた。

40

【 0 2 6 8 】

全抗体は、2 つのウサギ抗-hulgG Fc(ジャクソン、cat# 309-006 ~ 008) 及びが 2 つのヤギ抗-hulgG Fc が HRP(ジャクソン、cat# 109-036 ~ 098) に接合した F(ab') によって検出した F(ab') でおおわれているミクロタイタープレート上の希釈されたサンプルを暖めることによって Human Fc E L I S A を使用して決定された。1M の H3PO4 が反応を止めるために加えられた及び、TMB ペルオキシダーゼ基質溶液が発色現像(コケ、cat# TMBE-1000) のために用いられた。プレートは、450/620 ナノメートルでマイクロプレート読者(Biotek EL311

50

または等価物)に読み込まれた。

【0269】

サイズ-除外HPLC - Size-除外HPLCは3000桁、Phenomenex BioSep-SEC-Sを使用しているPBSにおいて実行された(7.8mm 300'、5mmの柱 (トランス(ネコ)。00H-2146-KO)pH 7.0及びpH 4.0から始まっているサンプルによって。pH 7.0のサンプルは、PBSにおいて希釈された;pH 4.0のサンプルは、200mMのCitric Acid(pH 3.0)を有するpHを低下させることによって発生した。移動比は30分の間の0.5ml/分であった。そして、isocraticだった。アナログ/デジタル変換器が25,000のunits/mVに課されたChemStationは、2秒、幅をピークまで上げる、4nMを切り開く(Agilent Technologies;35900Eネコ)。放射能は、raytestなラモーナ90と検出された(raytestな米国社;ウィルミントン(NC))標準のAgilent 1100 HPLCモジュール・システム(サンタクララ、CA)と同一線上に。

10

【0270】

タンパク質-Gビード抽出及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分離 - X-100(1%(v/v)の終濃度)トリトンProtein-Gビードの加算が続くサイズ-除外HPLCから集められる分數まで加えた(GE Lifesciences Inc(ネコ)。17-0885-01).サンプルが穏やかな回転を有する4°Cで終夜暖められてそれからビードが1% PBS +を有する4回洗われた及び、トリトンX-100。サンプルの半分がNuPageR Sample Reducing Agen(ネコ。NP0004)tを使用して減少した及び、各々のサンプルは分割された。ビードは、NuPAGER 4倍速LDS Sample Buffer(pH 8.4)(ネコ。NP00007) ± NuPAGER Sample Reducing代理人を有する既治療であって、5分の間の99°Cに孵化した;それから、NuPAGER 1x MOPS SDS Runningバッファ(ネコ。NP0001)を有するNuPAGER 4-12%のBis-トリス・ゲル類(ネコ。NP0321BOX)に適用される。ゲル類は、クーマシーBlue R250染料で染色された。全てのNuPAGER試薬は、インビトロゲン(株式会社)から得られた..

20

【0271】

質量分析及びバイオ情報科学分析 - SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から削除されるサンプルズは、前述したように治療された。簡潔には、以下の急速なin-solutionマイクロ波によって援助されたトリプシン性消化ペプチドは、逆相クロマトグラフィによって切り離されて、2kVのスプレー電圧を有するナノ・スプレー・イオン化源に直接抜き取られて、LTQ XL-Orbitrapマススペクトロメータ(サーモ・ウォクイキテン)を使用して分析された。前駆体イオンは、60,000の解像度でFTMSにおいて分析された。MS/MSは、トップ10の最も大量のイオンが断片化のために従属したそれによってデータ従属するモードで作動される計測器を有するLTQにおいて実行された。データは、Mascot Search Algorithm(マトリックスSciences)を使用してまたはデノボ解釈によって検索された。

30

【0272】

Mascotデータを検索するために:検索基準は、最高3つのミス裂開を有する可変変更様として、Y及び20ppmの最大限のMS耐性、Lys上のGlyGlyを有する0.5のDaのMS/MS耐性、MethionineのOxidation、Cys上の+57のDaおよびSTのPhosphorylationを含んだ。データは、SwissprotデータベースのMammalianサブセットに対して検索された。

40

【0273】

結果

LD1の特徴描写及び人間化。人間のキメラ抗体LD1(chLD1)は、人間のFGFR4を結合して、他のFGFリガンド及びFGF19によってシグナリングを遮断して、HUH7人間肝セルロース癌(HCC)異種移植片モデルの腫瘍成長を抑制することを示した。trastuzumab(図10)において使用する人間のVHサブグループIII(huIII)可変ドメイン・フレームワーク及び私(huKI)は、LD1、可変照明およびchLD1の重い領域の人間化ぶりのステップとして、人間のカッパに合わせられた。chLD1からの高度変異部は、直接的なCDR-移植片(hLD1.vA)を生成するために、これらの人間の可変枠に移植された。chLD1と比較してとき、FGFR4を結合するための表面プラスモン共鳴によって、hLD1.vAの親和性は約5倍の(図示せず)によって減少した。結合及びを改良する手段がLCの3つの重要なマウス副尺位置の識別に至ったので、可変照明および重い領域のさまざまな副尺位置のマウス・シーケンスの置換は調査された:P44F

50

、L46IおよびY49S。これらの変化は、chLD1(表3)と同等のFGFR4が好きだったhLD1.vBに取り入れられた。

【0274】

表3. 抗FGFR4抗体変異体の結合キネティクス。固定化抗体変異体へのヒトFGFR4結合の会合及び解離を表面プラズモン共鳴を使用して測定した。

LD1 Ab	kd (nM)	kon (M•sec-1)	koff (sec-1)
chLD1	0.45	3.82e5	1.73e-4
hLD1.vB	0.97	2.88e5	2.80e-4
hLD1.v22	.043	9.10e5	3.90e-5

10

20

30

40

50

【0275】

驚くべきことに、類似したFGFR4結合能(図11A)にもかかわらず、hLD1.vBは、n u / n uマウス(図11B)のHUH7人間HCC異種移植片モデルのchLD1と比較して、抗-腫瘍有効性を減弱させた。9日後に、PBSを有するマウス既治療のHUH7腫瘍は、ほぼ700のmm³の平均量に増大した。chLD1処置群において、平均HUH7腫瘍ボリュームはほぼ400のmm³であった。そして、PBS治療をうけている動物の腫瘍と比較して腫瘍成長の43%の抑制を表した。しかしながら、hLD1.vBを有するマウス既治療の平均腫瘍ボリュームはほぼ600のmm³であった。そして、PBS治療をうけている動物の腫瘍と比較して腫瘍成長の14%の抑制を表した。

【0276】

胸腺欠損なNCRヌードマウスにおいて行われるhLD1.vB及びchLD1の薬物動態学的評価は1mg/kgの点滴(132のmL/day/kg及び140、それぞれ)でchLD1およびhLD1.vBのための急速クリアランスを現した。そして、目標がクリアランス機構を調停したことを示唆した。このクリアランス機構は、20mg/kgの高用量でchLD1のために飽和するように見えた。これで観察されたクリアランスの一回分を盛ること(11.7mL/day/kg; 11C図)マウス(P. タイル個人連通及びref. 17)の典型的ヒト化抗体のために観察される目標から独立したクリアランスの範囲(6-12mL/day/kg)においてあった。しかしながら、hLD1.vBは、急速にクリアされ続けた(34.2のmL/day/kg; 11C図)。これは、hLD1.vBのための付加的なクリアランス機構がマウス異種移植片モデルの効力の見かけの欠如の原因となることが示唆されることを示唆した。

【0277】

PKの発見と整合して、125I-hLD1.vB及び125I-chLD1を使用している生体分布研究でかなり異なる配布側面図(図11D)が現れた。125I-hLD1.vBの限定量だけが2時間(~80対35%のID/g)だけ等価量で肝臓で見つかると共に、125I-chLD1は特に急速に及びを肝細胞上のFGFR4の高い表示による肝臓に配布した。対照的に、これらの抗体の観察された配布は、競争している相互作用が生体内で、全体の放射能の損失に至った抗体安定性の損失に対して肝臓にhLD1.vBの配布を予防したことを示唆している血液において逆転した。

【0278】

C3干渉の識別。hLD1.vB及びchLD1の間で観察される生体内での違いを調停する努力において、我々は、それらの機能に影響を及ぼすかもしれない潜在的外れた目標プラズマまたは組織相互作用と同様に、プラズマの抗体安定性を評価した。37 °Cの48時間のマウス、ネズミ、サルまたは人血しょうのhLD1.vBがFGFR4結合活性および完全な人間の免疫グロブリンG集中の評価によってあとに続いた又は、プラズマ安定性はchLD1を暖めることによって評価された。全体のchLD1またはhLD1.vB集中ELISAが変えなかった(図示せず)免疫グロブリンGで測定されるにつれて、FGFR4 ELISAによって検出されるhLD1.vBの回復がPBS/BSA(図12A)の制御潜伏と比較してネズミ・プラズマ及びマウスにおいてかなり還元している(~30%によって)て。対照的に、試験されるいかなる状態ものchLD1 FGFR4結合活性

の損失が、なかった。hLD1.vB回復の重要な減少は、特に齧歯目のプラズマから、損失が低下、しかし、よりたぶん齧歯目のプラズマの干渉する複合体の形成によらないことを示唆した。マウス・プラズマを有するhLD1.vBの相互作用がより高分子量複合体の生成に結果としてなるかもしれない、hLD1.vB及びヨード化されたchLD1はまた、プラズマにおいて暖められて、サイズ-除外HPLCを使用して分析された。高分子量ピークは、125I-chLD1でなく125I-hLD1.vBを含んでいるマウス・プラズマ・サンプルだけにおいて、検出された。150kDaの予想される抗体ピークに加えて、およそ550kDaがそうであったおよそ270の及びに対応するピークがまず最初に検出され(図12B)て、しかしながら48h、150および270kDaのピークだけは、残った;550kDaのピークは、もはや観察されなかった。これらのより高分子量ピークは、人血しょうまたはPBS/BSAを含んでいるhLD1.vB及びカニクイザルにおいてまたはchLD1(図15)を含んでいるいかなるサンプルにもおいて検出されなかった。面白いことに、これらの高分子量ピークの存在は、直接FGFR4 E L I S Aで得られた抗体回復データと相關した。更に、分析がpH 4.0(図15)で実行されるときに、これらのピークの存在は減弱した。そして、更にマウス血清を有するhLD1.vB従属する相互作用を支えた。

10

【0279】

マウス・プラズマの免疫沈降は、chLD1(図12C)でなく、hLD1.vBを使用して、選択的に下げられた1ca. 37kDaのタンパク質を現した。サイズ-除外HPLCから所見と整合して、この37kDaのタンパク質バンドはカニクイザルでないおよび人血しょうサンプル(図16A-C)以外のネズミにおいて観察された。さらにまた、タンパク質は、hLD1.vB(図16D)によって薬をのむマウスから、プラズマにおいて検出された。37kDaのマウス血漿タンパクに由来するトリプシン性ペプチドのMS/MS分析は、このバンドをマウス補足C3(図12D)に由来すると確認した。C3の直接の参加は、C3ノックアウト(ko)マウス(図17)からプラズマにおいて暖められるhLD1.vBの完全な回復で支えられた。

20

【0280】

結合しているC3のRe-評価及び親和性成熟。chLD1およびhLD1.vBは、補完的な決定地方(CDRs)及び同じ人間の恒常部を共有して、このようにそれらの可変ドメイン・フレームワークだけによって異なる。更に、hLD1.vBを人間らしくするために使用する光およびH鎖可変ドメイン・フレームワークは、相同の非常に高い程度をマウス血清タンパクを有する相互作用を呈することが報告されなかったtrastuzumabを含んでいるいくつかのヒト化抗体と共有する。このように、マウスC3を有するhLD1.vBの外れた目標相互作用は、たぶん人間の可変ドメイン・フレームワークを有するマウスLD1 CDRsの特定の組合せから生じた。

30

【0281】

我々は、hLD1.vB(バクテリオファージに表示されるF a b フラグメントの親和性成熟から生じた)のCDRシーケンスのいくつかの変化が結合しているマウスC3の付随する損失を有するFGFR4のための改良された親和性につながることができると結論した。免疫グロブリンG及びがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析に連結する免疫沈降分析を使用しているマウスC3を有する潜在的相互作用に関しては同様にFGFR4結合能を検査したので、バクテリオファージ選択された異型は表された。hLD1.vB(H52L、S53VおよびD60E、図10)と比較したCDR-H2の3つのアミノ酸変化によって、1つの異型(hLD1.v22)は、FGFR4(表3)のための改良された結合能および締め具の損失がC3(図13B)を補足することを示した。

40

【0282】

マウス補足C3が生体内にhLD1.v22及びhLD1.vBのクリアランスを変えた程度は、20mg/kgでC3 koマウスをC3 wtマウスと比較している薬物動態学的研究において評価された。NCRマウスにおいて以前に観察されるにつれて、hLD1.vBはC3 wtマウス(29のmL/day/kg)の循環から急速にクリアされた;しかしながら、chLD1およびhLD1.vBは、C3 koマウス(表4及び図14A)の相似薬物動態学的輪郭(8.7の9.3のmL/day/kgのクリアランス、それぞれ)を有した。

【0283】

表4. 20mg/kg IVで投与される抗FGFR4変異体の薬物動態パラメーター

50

c	AUC (day*ug/mL)	Cmax (ug/mL)	CL (mL/day/kg)	Beta HL (day)	V1 (mL/kg)	Vss (mL/kg)
chLD1 C3 ko	2294 (203)	483 (42)	8.7 (0.77)	7.1 (1)	41 (3.6)	86 (6.8)
hLD1.vB C3 ko	2143 (161)	530 (51)	9.3 (0.70)	5.9 (0.6)	38 (3.6)	78 (5.1)
chLD1 C3 wt	2937 (325)	489 (62)	6.8 (0.76)	7.9 (1.3)	41 (5.2)	76 (6.9)
hLD1.vB C3 wt	688 (48)	376 (30)	29 (2.06)	2.5 (0.3)	53 (4.2)	97 (8.8)
chLD1 NCR nude	1696 (85)	335 (21)	11.8 (0.59)	5.8 (0.4)	60 (3.7)	97 (4.5)
hLD1.vB NCR nude	428 (22)	256 (15)	46.7 (2.46)	2.3 (0.2)	78 (4.6)	139 (9.9)
hLD1.v22 NCR nude	1777 (119)	338 (24)	11.3 (0.75)	6.5 (0.6)	59 (4.1)	103 (5.6)

【 0 2 8 4 】

これらのデータは、組織配布データと整合していく、生体内マウス補足C3を有する特定の相互作用がhLD1.vBの急速クリアランスに至ることを確認する。hLD1.v22がC3と結合しない及びhLD1.vBのクリアランスがC3 koマウスにおいて大幅に改善されているので、我々はhLD1.v22がNCRヌードマウスのchLD1に類似した薬物動態学的側面を有することを予期した。図14B(我々の前の所見と整合した間hLD1.v22がNCRヌードマウス(11.8の11.3のmL/day/kgそれぞれ)において同様の及びchLD1のクリアランス)に示すように、hLD1.vBは、急速にクリアされる(46.7のmL/day/kg)。

【 0 2 8 5 】

HUH7 HCC異種移植片モデルの腫瘍成長を阻害するhLD1.v22の能力は、hLD1.vB及びchLD1と比較して評価された。21日後に、PBSを有するマウス既治療のHUH7腫瘍は、ほぼ2,100のmm³(図14C)の平均量に増大した。PBS-処置群の15匹の動物の中で、3匹は、腫瘍ボリューム限度(ほぼ2,500のmm³)による研究の端の前に安楽死した。hLD1.vB処置群において、平均HUH7腫瘍ボリュームはほぼ1,200のmm³であった。そして、PBS治療をうけている動物の腫瘍と比較して腫瘍成長の43%の抑制を表した。しかしながら、hLD1.v22を有するマウス既治療の平均腫瘍ボリュームは、ほぼ530のmm³であった。この結果は、平均HUH7腫瘍ボリュームがほぼ350のmm³であったchLD1既治療マウスと同等だった。hLD1.v22およびchLD1処置群のために、これは、腫瘍サイズの83%の減少及び、それぞれ、75%がPBS車両治療群と比較されることを表す。グループのダブリングタイムがhLD1.vB(12.2日)、hLD1.v22(15.8日)またはchLD1(17.1日)で扱った腫瘍は、かなりPBS-処置群(8.2日)のそれより大きい。加えて、hLD1.v22またはchLD1-処置群の腫瘍ダブリングタイムは、hLD1.vB処置群のためのそれよりかなり長かった。hLD1.v22およびchLD1の類似した生体内でのパフォーマンスは、hLD1.vBに匹敵して、マウス補足C3を有する特定の外れた目標相互作用によって下部の露出に結果としてなっているさらなる一掃が生じていたことを強く意味して、hLD1.vBの有効性を減らした。

10

20

30

40

50

【0286】

このように、抗-FGFR4抗体hLD1.v22の生成は、次の工程を有した：1)人間のIgG1不变領域及びLD1のVH領域及び、ネズミのVLを含んでいる人間のキメラLD1(chLD1)の生成；2)chLD1から、直接のHCR移植片をつくって、人間のVHサブグループIII可変ドメイン及び私が接ぎ木をする人間のVLカッパへの6つのネズミのHVRsの移植片が、抗体hLD1.vA.を生成する抗体hLD1.vAは、ChLD1未満の5倍について、FGFR4を結合した；3)、L鎖突然変異P44F、L46IおよびY49Sの導入は、抗体hLD1.vBに結果としてなった。抗体hLD1.vBは抗体chLD1がそうしたより弱く人間のFGFR4を約2倍で縛った、しかし、hLD1.vBが生体内で腫瘍有効性(chLD1と比較して生体内急速クリアランス)を減らして、マウス補体タンパク質C3を結合するところわかった；4)、親和性成熟は実行された、そして、FGFR4に結合能を改良されるHVR H2(H52L、S53V、D60E)に対する3つの変化の加算はマウス補足c3タンパク質に締め具を除去した。結果として生じるヒト化および親和性成熟された抗体(抗体hLD1.v22)は、chLD1に相当する生体内での有効性、pKおよび組織配布を有した。さらにまた、人間の異種移植片腫瘍研究の癌を阻害する際の実施例のために、抗体hLD1.v22は、親のようなchLD1抗体として少なくとも相当する生物学的活性度を有するために決定された。

10

【0287】

部分的参照リスト

1. James LC, Roversi P, Tawfik DS. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* 2003; 299:1362-7.
2. Krishnan L, Sahni G, Kaur KJ, Salunke DM. Role of antibody paratope conformational flexibility in the manifestation of molecular mimicry. *Biophys J* 2008; 94: 1367-76.
3. Notkins AL. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 2004; 25:174-9.
4. Thorpe IF, Brooks CL, 3rd. Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:8821-6.
5. Yin J, Beuscher AE, Andryski SE, Stevens RC, Schultz PG. Structural plasticity and the evolution of antibody affinity and specificity. *J Mol Biol* 2003; 330: 651-6.
6. Thielges MC, Zimmermann J, Yu W, Oda M, Romesberg FE. Exploring the energy landscape of antibody-antigen complexes: protein dynamics, flexibility, and molecular recognition. *Biochemistry* 2008; 47:7237-47.
7. Feyen O, Lueking A, Kowald A, Stephan C, Meyer HE, Gobel U, et al. Off-target activity of TNF- α inhibitors characterized by protein biochips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008; 391:1713-20.
8. Kijanka G, Ipcho S, Baars S, Chen H, Hadley K, Beveridge A, et al. Rapid characterization of binding specificity and cross-reactivity of antibodies using recombinant human protein arrays. *J Immunol Methods* 2009; 340:132-7.
9. Lueking A, Beator J, Patz E, Mullner S, Mehes G, Amersdorfer P. Determination and validation of off-target activities of anti-CD44 variant 6 antibodies using protein biochips and tissue microarrays. *Biotechniques* 2008; 45:Pi-v.
10. Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J Mol Biol* 2007; 368:652-65.
11. Rosenwald S, Kafri R, Lancet D. Test of a statistical model for molecular recognition in biological repertoires. *J Theor Biol* 2002; 216:327-36.
12. James LC, Tawfik DS. The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness. *Protein Sci* 2003; 12:2183-93.

20

30

40

50

13. Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W, Schneider-Mergener J. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell* 1997; 91:799-809.
14. French DM, Lin BC, Wang M, Hotzel K, Bolon B, Ferrando R, et al. Targeting F GFR4 Inhibits Hepatocellular Carcinoma in Preclinical Animal Models. *J Clin Invest* 2011; Submitted.
15. Dennis MS. Humanization by CDR Repair In: Shire S, Gombotz W, Bechtold-Peters K, Andya J, eds. *Pharmaceutical Aspects of Monoclonal Antibodies*. New York: Co-published by the Association for Pharmaceutical Scientists & Springer, 2010:9-28.
16. MacCallum RM, Martin ACR, Thornton JT. Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. *Journal of Molecular Biology* 1996; 262:732-45.
17. Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, et al. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:717-27.
18. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* 2005; 20:17-29.
19. Lutz HU, Jelezarova E. Complement amplification revisited. *Mol Immunol* 2006; 43:2-12.
20. Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunological Reviews* 2001; 180:35-48.
21. Manderson AP, Pickering MC, Botto M, Walport MJ, Parish CR. Continual low-level activation of the classical complement pathway. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194:747-56.
22. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *The Journal of Immunology* 2006; 176:1305-10.
23. Sahu A, Pangburn MK. Covalent attachment of human complement C3 to IgG. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:28997-9002.
24. Vidarte L, Pastor C, Mas S, Blazquez AB, de los Rios V, Guerrero R, et al. Serine 132 is the C3 covalent attachment point on the CH1 domain of human IgG1. *J Biol Chem* 2001; 276:38217-23.
25. Osmers I, Szalai AJ, Tenner AJ, Barnum SR. Complement in B6B/BN mice revisited: serum C3 levels and complement opsonic activity are not elevated. *Mol Immunol* 2006; 43:1722-5.
26. Otte L, Knaute T, Schneider-Mergener J, Kramer A. Molecular basis for the binding polyspecificity of an anti-cholera toxin peptide 3 monoclonal antibody. *J Mol Recognit* 2006; 19:49-59.
27. Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Analytical Biochemistry* 2000; 278:123-31.
28. Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detected protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Research* 2000; 28:i-vii.
29. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991; 251:767-73.
30. Forster R, Valin M, Lemarchand T, Palate B, Fifre A. Validation of tissue cross reactivity (TCR) studies: Tissue cross reactivity of anti-human CD209 in cynomolgus tissues. *Toxicology Letters* 2009; 189:S100-S.

31. Kallioniemi O-P, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 10:657-62.
32. Lynch C, Grewel I. Preclinical safety evaluation of monoclonal antibodies. In: Chernajovsky Y, Nissim A, eds. *Therapeutic Antibodies: Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag, 2008:19-44.
33. Dennis MS. CDR Repair: A novel approach to antibody humaization. In: Shire S J, Gombotz W, Bechtold-Peters K, Adndya J, eds. *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*. New York: Springer, 2010:9-28.
34. Gallop MA, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SPA, Gordon EM. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem* 1994; 37:1233-51. 10
35. Lee CV, Liang W-C, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Bio* 2004; 340:1073-93.
36. Circolo A, Garnier G, Fukuda W, Wang X, Hidvegi T, Szalai AJ, et al. Genetic disruption of the murine complement C3 promoter region generates deficient mice with extrahepatic expression of C3 mRNA. *Immunopharmacology* 1999; 42:135-49.
37. Chizzonite R, Truitt T, Podlaski FJ, Wolitzky AG, Quinn PM, Nunes P, et al. IL-12:Monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biological activity on activated human lymphoblasts. *The Journal of Immunology* 1991; 147:1548-56. 20
38. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 2009; 137:721-35.

【0288】

前述の本発明が理解の明快さのために図と例とをあげて若干の詳細に記載されていたにもかかわらず、実施例及び説明は本発明の範囲を制限するものとして解釈されてはならない。本願明細書において引用される科学文献及び全ての特許の開示は、参照によってそれらの全部にはっきりと取り入れられる。

【図 1 A】

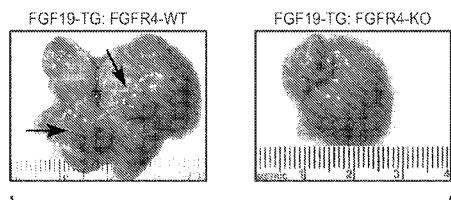


FIG. 1A

【図 1 C】

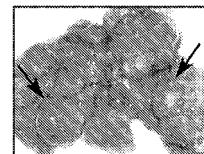


FIG. 1C

【図 1 B】

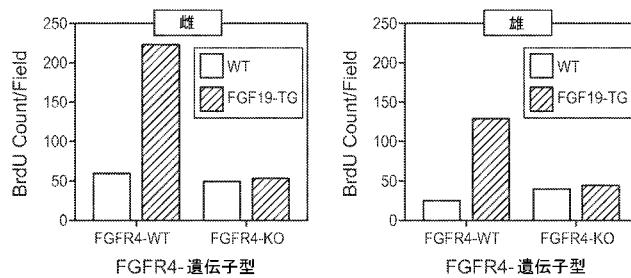


FIG. 1B

【図 1 D】

年齢(月)	性別	腫瘍の肉眼エビデンス	腫瘍の組織学的エビデンス
4	F	9/10	10/10
	M	9/10	10/10
5	F	10/10	10/10
	M	9/10	10/10
6	F	10/10	10/10
	M	10/10	10/10
7	F	10/10	10/10
	M	6/6	6/6

FIG. 1D

【図 1 E】

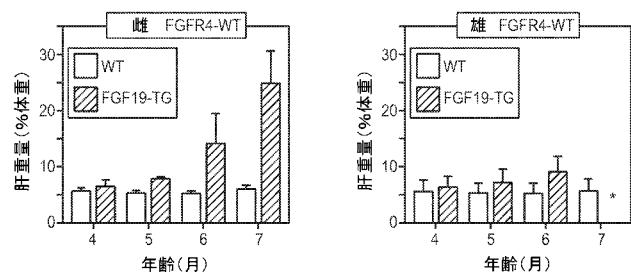


FIG. 1E

【図 2 A】

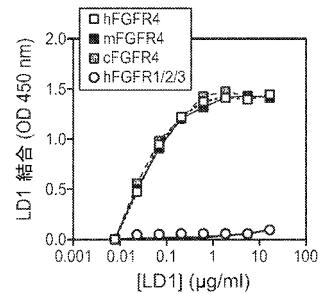


FIG. 2A

【図 1 F】

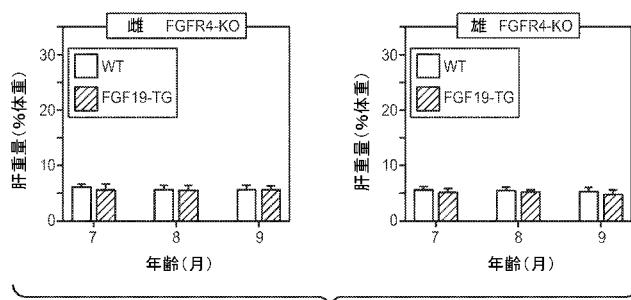


FIG. 1F

【図 2 B】

FGFR4 種	Kd (nM)
マウス	0.7
カニクイザル	0.8
ヒト	0.7

FIG. 2B

【図 2 C】

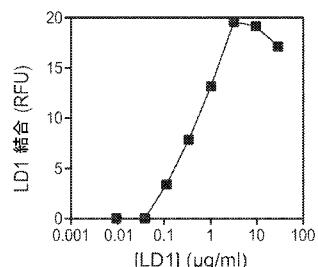


FIG. 2C

【図 2 D】

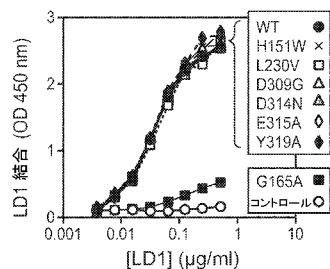


FIG. 2D

【図 2 E】

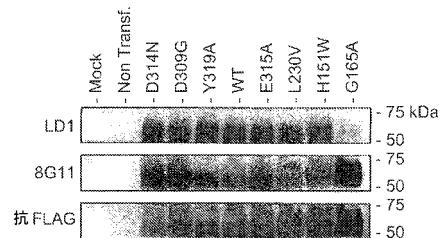


FIG. 2E

【図 2 F】

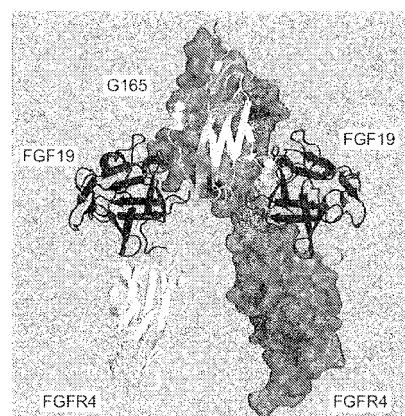


FIG. 2F

【図 3 A】

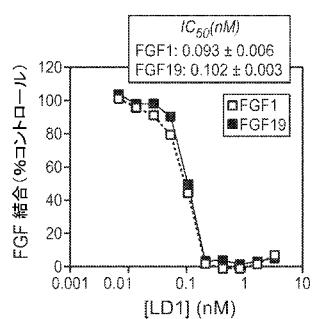


FIG. 3A

【図 3 B】

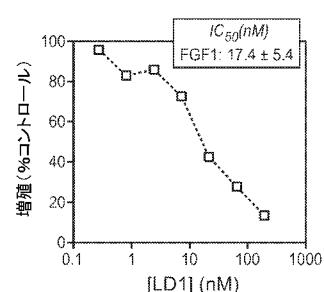


FIG. 3B

【図 3 C】

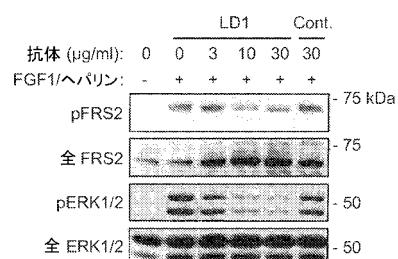


FIG. 3C

【図 3 D】

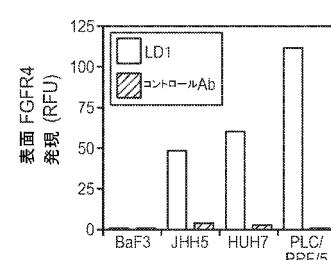


FIG. 3D

【図 4 A】

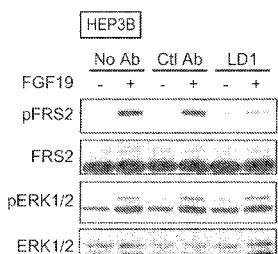


FIG. 4A

【図 4 B】

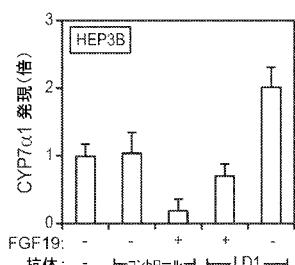


FIG. 4B

【図 4 C】

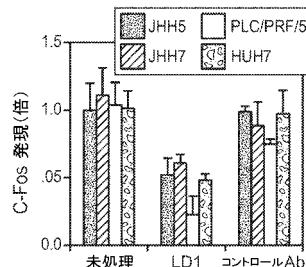


FIG. 4C

【図 4 D】

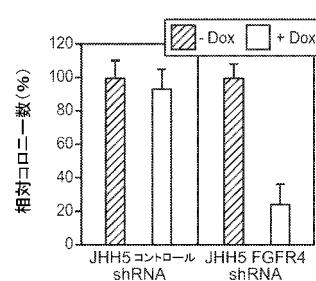


FIG. 4D

【図 4 E】

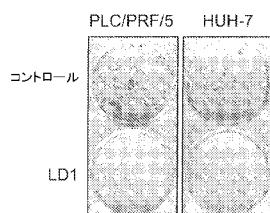


FIG. 4E

【図 4 F】

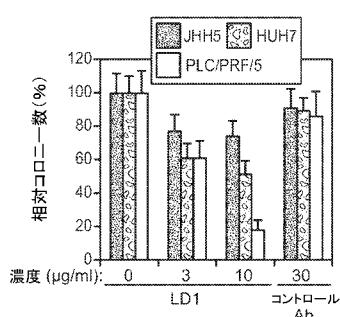


FIG. 4F

【図 5 A】

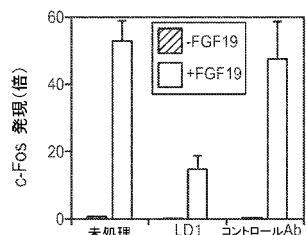


FIG. 5A

【図 5 B】

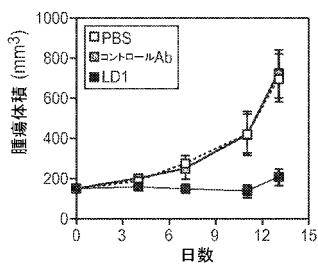


FIG. 5B

【図 5 C】

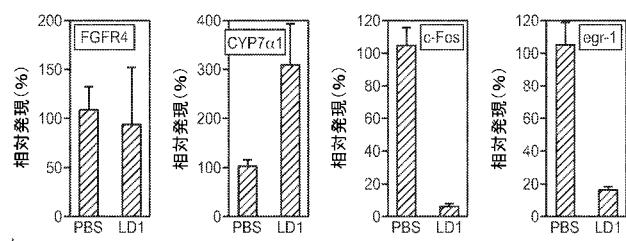


FIG. 5C

【図 5 E】

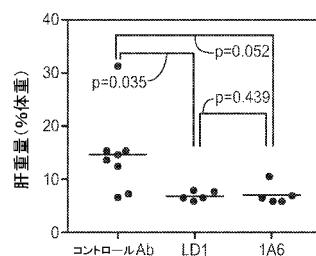
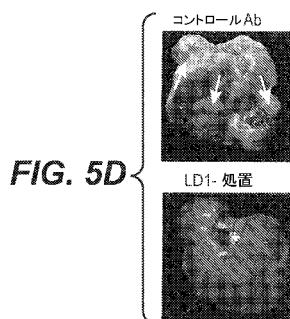


FIG. 5E

【図 5 D】



【図 6 A】

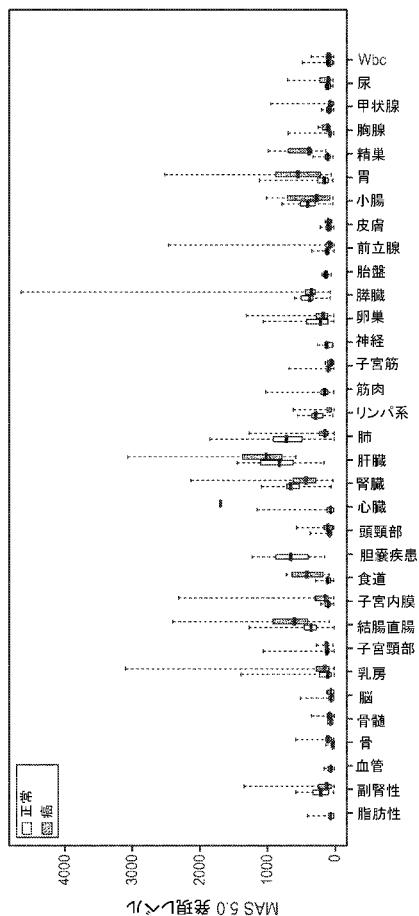


FIG. 6A

【図 6 B】

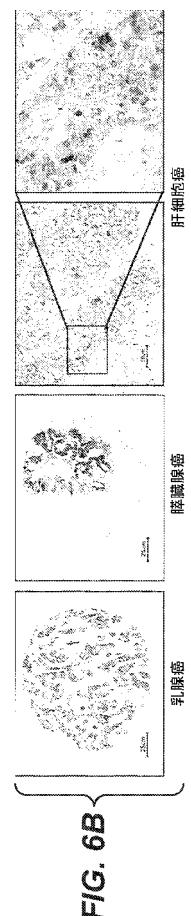
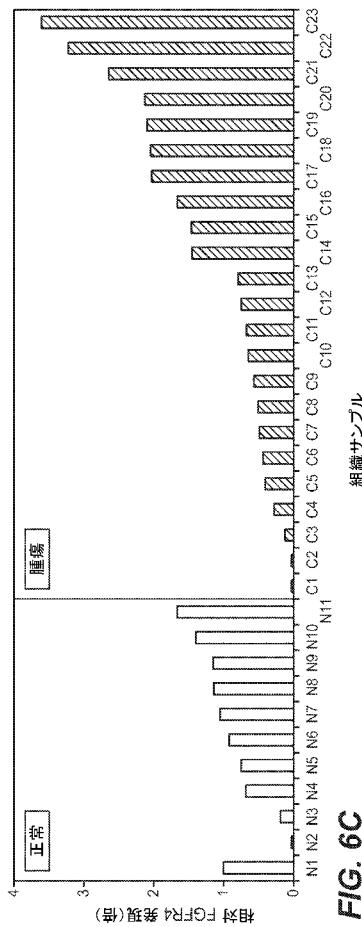


FIG. 6B

【図 6 C】



【図 7 A】

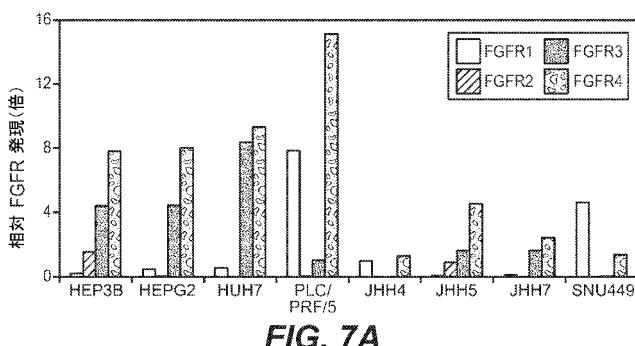


FIG. 7A

【図 7 B】

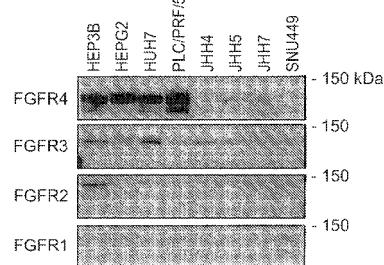


FIG. 7B

【図 8】

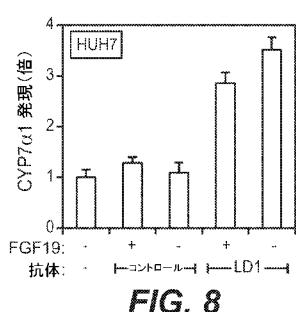


FIG. 8

【図 10 A】

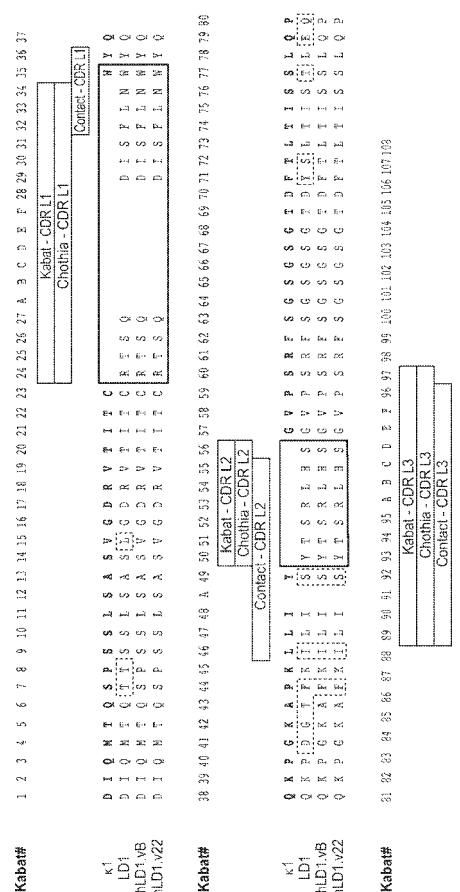


FIG. 10A

【図 9】

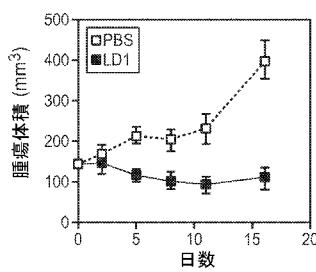


FIG. 9

Kabat# 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 A 3 C 5 E 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat-CDR L1
Chothia-CDR L1
Contact-CDR L1Kabat-CDR L2
Chothia-CDR L2
Contact-CDR L2Kabat-CDR L3
Chothia-CDR L3
Contact-CDR L3

LD1	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I S P I N N Y Q
hLD1-WB	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I S P I N N Y Q
hLD1-m22	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I S P I N N Y Q
	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I O W T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	D I S P I N N Y Q

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

LD1	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P
hLD1-WB	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P
hLD1-m22	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P
	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P	Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S G S G G T D P T L I S S L Q P

Kabat# 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

LD1	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C
hLD1-WB	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C
hLD1-m22	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C
	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C	E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C E D F A T Y Y C

【図 10B】

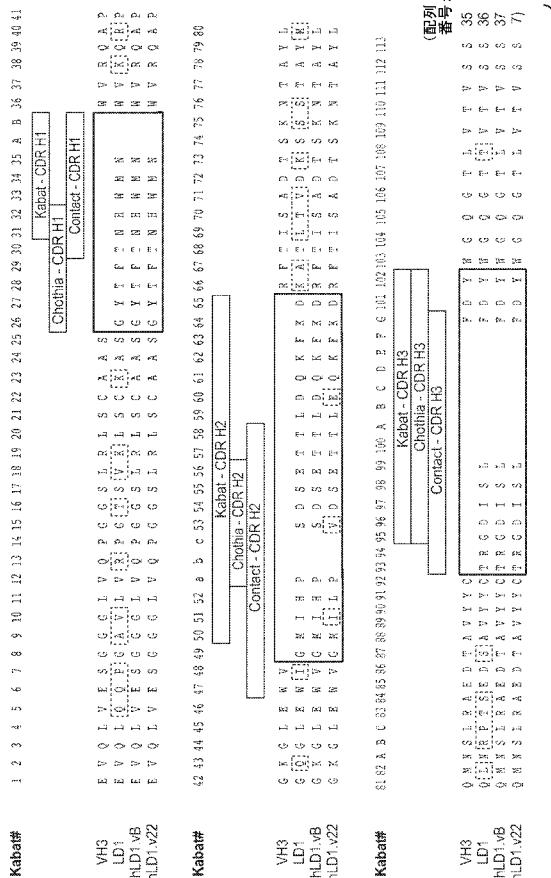


FIG. 10B

【図 11A】

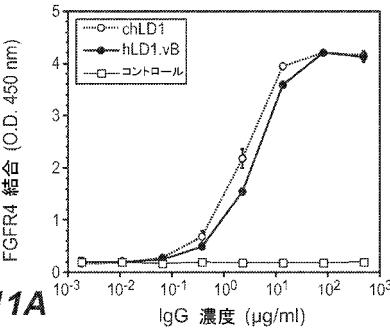


FIG. 11A

【図 11B】

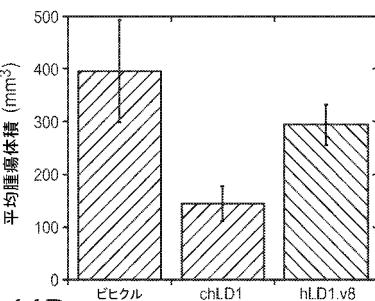


FIG. 11B

【図 11C】

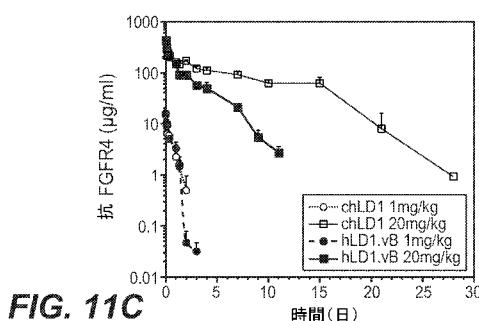


FIG. 11C

【図 12A】

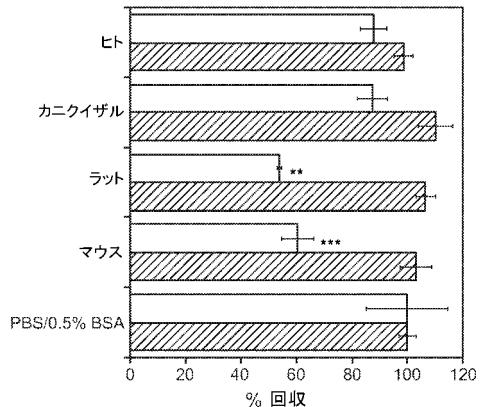


FIG. 12A

【図 11D】

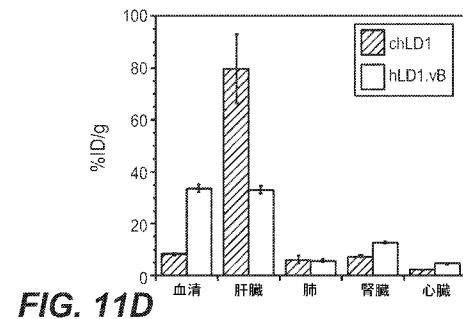


FIG. 11D

【図 12B】

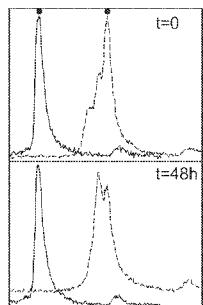


FIG. 12B

【図 12D】

MGPGSSOLVLLASSPLAIGPMYSITPTVPLRLESEETIVLEADQGDTIPVTVYDPLKQVLTSEKTVLIT
 GASHLASVSGTVEKLLTIPKPKRULSNNNGQGILPUNIIFLYNMGKVKRPFHAKQPSAFEV
 KEYVLPPEFVEPTEETYIDDPGLVEVLTAKFLYGVNDVDTAVVNGTGETVRAVMTSFGCIVF
 TVNNTLNGVETGTVLLETPCIPKPKRULSNNNGQGILPUNIIFLYNMGKVKRPFHAKQPSAFEV
 KEVYLPEFVEPTEETYIDDPGLVEVLTAKFLYGVNDVDTAVVNGTGETVRAVMTSFGCIVF
 DAVITTRVLLMEGVRPSNADALVGSLSYPSVTVLISGSDMVTAERSGIPIVTSPQIHFPTKPKFPRPMPF
 DLAYTEVNPDPGSPASKVLTIVTQGENAKATMDDGPKAISINPENSOQPTITPTKPKFPRPMPF
 AHPTVSTHRDFAKYYVYDQKPKFPRPMPF
 DIAVILSUTPTEPTEPSEFLVXVYXVTLIGASQRENTADSWVYKDKSISGPTVYKPKFPRPMPF
 GNGQARYLVAADGQVPLVNLKNTLQTKRITMUVVKPKDGTGPGSKRNQVMDAATKTSGLQTE
 QRADLECTPKPARRSVYOLMFRNDKAGOTDQGKTRGCDGMDTARYSOSRARIITGENCEIKA
 FIDDCNTTFLKRECHRDDEVIGLARSELEDTIPEDILSRHSEPOSNTLLEPEPENGISTKVNNTLFLKD
 SITTWELIAVSLSDQKKGIVADPPEITRMDQFIDLRLPDYSSVTRNQVEFRAULNVREPEBLKVRVLELLNPA
 FGCMATWNRTECOTKPKPSVATVYVTPKISQGQFVEVAAVENHISDQYKVKLKVYPMERIUKYVIAH
 TLDPEKIGQGAVQKVDPVADLSDQVDPDSEPRFLIQQSPVQMDADVGPRLKHLITVPGCZGQNM
 GMPTPTVAVHLDOTEOKEKGIERCEALELIKGYTQOLAEKOPSSAYAATNNRSPSWLTAZYXVKVS
 LAANLLIAIDSIVLCAVETKWLLEKOPDSEVQEDVQETIGGERNAEALVTAFLIAEARDTICEG
 QVNLSSPSTINKAGEYTFEASVYNLQPPVYTAGVLAIAKNEKEPPVNLAKDPRNQEEFPOOLYNE
 ATSTVALLAIIKQDSDTPPVYRNEQYXGGGSSSTQATMFEALQACYQDYPFHQLDNMVSPLP
 ERSSSATTEFLWNLQMLRSEETRONEAFSLAKSGKGTLSVAVTHAKLKSQVCKKEDLRSVIRAPE
 TAKKPEAKNTMFIEIUTKYGIVDIAATSLDLSANTGPAFKDLELLASGDYDTISKEMNAFKNTLII
 YLEKISHTEEEDCLTQVHQQYFNGLQPSAVKTVSYNEESTREYHEPKDQGMSKLHSEMCRAEEN
 CPMQSSZEKINLNTFLDACEPQGVDYVXKTELNTKLIQDDEYTTIQVITGSDEVAGQCKRKLHITK
 CRNALKQKQGKYLQMLWGLSISDANGKPKTSYIQLGDTWHEHWEAPECQPKQKQEELEGATTESMV
 YGGPN (黒列番号: 38)

FIG. 12D

【図 12C】

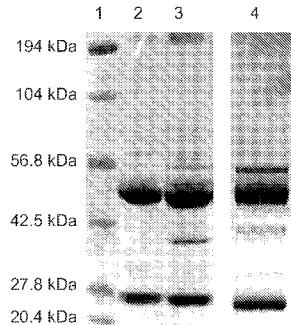


FIG. 12C

【図 13A】

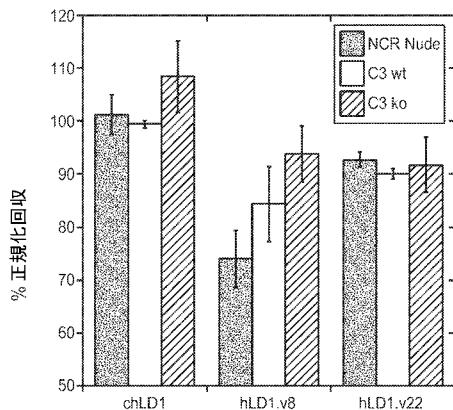


FIG. 13A

【図 13B】

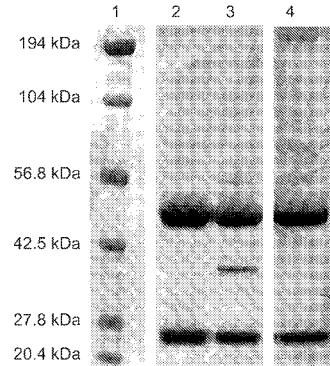


FIG. 13B

【図 14A】

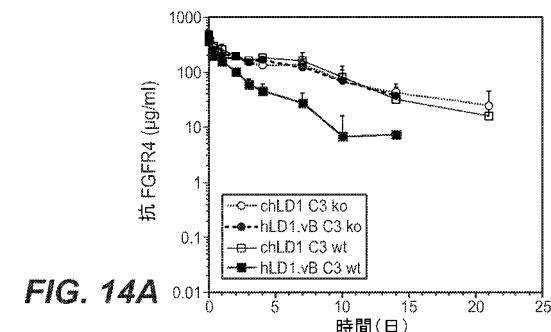


FIG. 14A

【図 14 B】

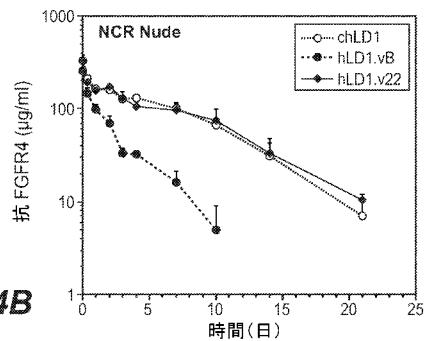


FIG. 14B

【図 15 A】

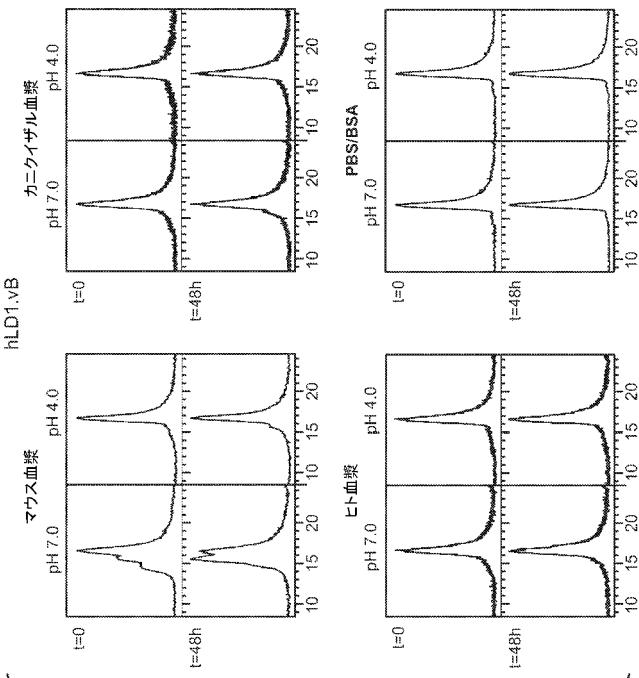


FIG. 15A

【図 14 C】

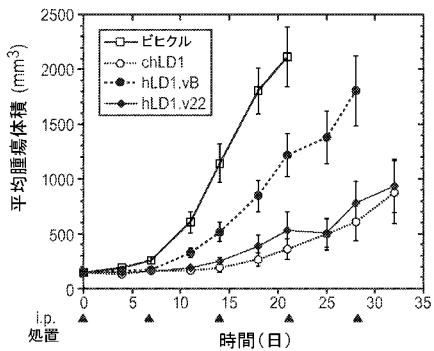


FIG. 14C

【図 15 B】

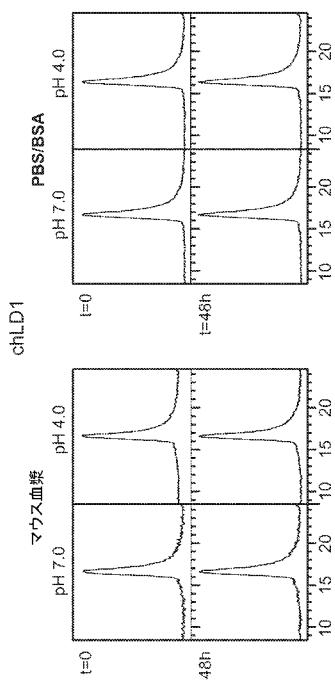


FIG. 15B

【図 15 C】

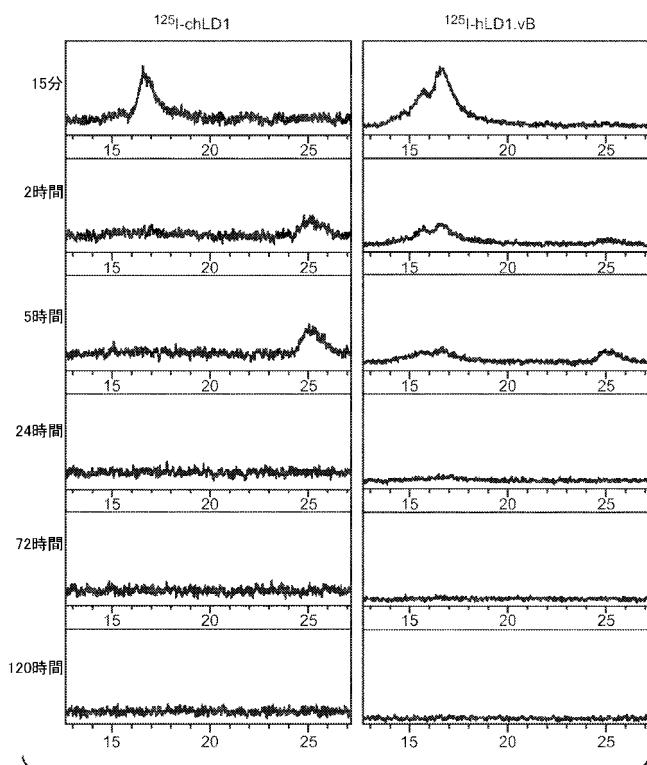


FIG. 15C

【図 16 A】

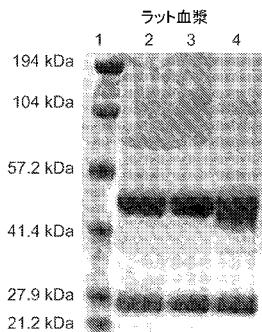


FIG. 16A

【図 16 C】

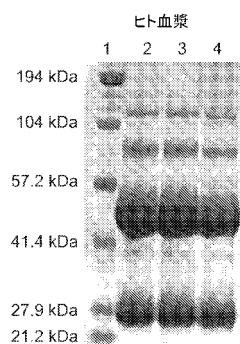


FIG. 16C

【図 16 B】

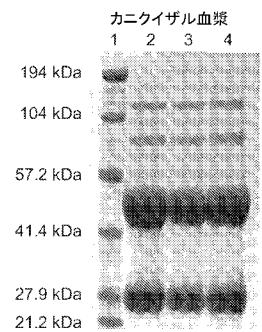


FIG. 16B

【図 16 D】

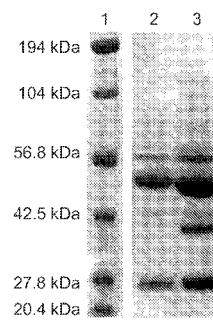


FIG. 16D

【図 17】

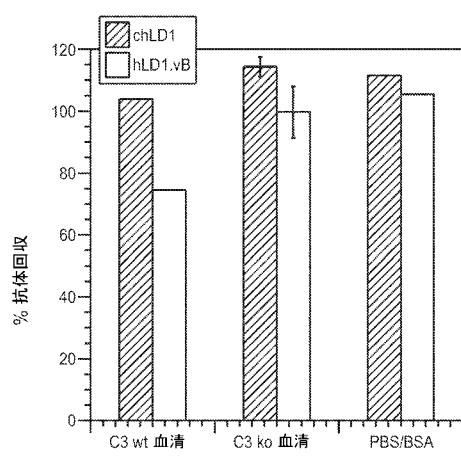


FIG. 17

【図 18】

MRLLLALLGVLLSVPGPVVLSEASEEVELEPCLAPSLEQQEQELTVA
 LGQPVRLLCGRRAERGGHHYKEGSRLAPAGRVRGWRGRLEIASFLP
 EDAGRYILCLARGSMIVLQNLTLLITGDSLTSNNDEDPKSHRDPNSNR
 SYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAvPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLK
 DQQAFHGENRIGGIRLRLHQHWSLVMESVVPSDRTYTCVLVENAVGSI
 RYNYLLDVLERSPHRPTLQAGLPANTTAVVGSDDVELLCKVYSDAQPHI
 QWLKHITVINGSSFGADGFPYVQVLKADINSSEVEVLYLRLRNVSAEDAG
 EYTCLAGNSTIGLSQLQANLTVLFEDPTWTAAPFARVYTDIILYASGS
 LALALVLLLLAGLYRGQALIGRHPPPATVQKLSRPPILARQFSLESGG
 SGKSSSSLVRGVRLSSSGPALLAGLVSLDLPLDPLWEFPDRRLVLGK
 PLIGEGCFQGVVRAEAFCGMQDAPRDQASTVAVKMLKDQASDKDLADL
 VSEMEVMKLLIGRHKNITINLLGVCTQEGPLYVIVECAAKGNLREFLRAR
 RPPGPDLSPDGPSSGPILSFPVVLVSCAYQVARGMQYLESRKCIRH
 DLAARNVLVTEDNVMKTIADFGTLARGVHIDYYKKTTSNGRLPVKMAP
 EALFDFRVYTHQSDVWSFGILLWEITLGGSPYPGTIPVEELFSLLREGH
 RMDRFPHCPPELYGLMRECWHIAAPSQRPTFKQLVEALDKVLLAVSE
 EYLDLRLTFFGPYSPSGGDASSTCSSSDSVFSHDPLPLGSSSFPGSG
 VQTEFT (配列番号: 39)

FIG. 18

【配列表】

2014516511000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2012/032491
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	BUMBACA DANIELA ET AL: "Highly specific off-target binding identified and eliminated during the humanization of an antibody against FGF receptor 4.", MABS 2011 JUL-AUG LNKD- PUBMED:21540647, vol. 3, no. 4, July 2011 (2011-07), pages 376-386, XP009159783, ISSN: 1942-0870 the whole document ----- -/--	1-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 1 June 2012		Date of mailing of the international search report 12/06/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/032491

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	DOROTHY M. FRENCH ET AL: "Targeting FGFR4 Inhibits Hepatocellular Carcinoma in Preclinical Mouse Models", PLOS ONE, vol. 7, no. 5, 1 January 2012 (2012-01-01), pages E36713-E36713, XP55028245, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0036713 the whole document -----	1-41
X	WO 2010/004204 A2 (SANOFI AVENTIS [FR]; BAURIN NICOLAS [FR]; BERNE PIERRE-FRANCOIS [FR];) 14 January 2010 (2010-01-14)	1,6-8, 12-14, 26-31, 33-39,41
Y	the whole document	2-5, 9-11, 15-25, 32,40
X	CHEN CHAOYUAN ET AL: "Generation and characterization of a panel of monoclonal antibodies specific for human fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4)", HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 24, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 152-159, XP002467618, ISSN: 0272-457X, DOI: 10.1089/HYB.2005.24.152	1,12
Y	the whole document	2-5, 9-11, 15-25, 32,40
Y	WO 2010/026291 A1 (LICENTIA LTD [FI]; ALITALO KARI [FI]; LEHTI KAISA [FI]; KESKI-OJA JORM) 11 March 2010 (2010-03-11)	2-5, 9-11, 15-25, 32,40
Y	the whole document	
Y	WO 2008/052796 A1 (U3 PHARMA AG [DE]; BANGE JOHANNES [DE]; NIEWOEHNER JENS [DE]; AUS DEM) 8 May 2008 (2008-05-08)	2,5,9, 10, 15-25, 32,40
Y	the whole document in particular, pages 22-24	
Y	WO 2005/066211 A2 (FIVE PRIME THERAPEUTICS INC [US]; ZENG CHANGJIANG [US]; HESTIR KEVIN I) 21 July 2005 (2005-07-21)	2-5, 9-11, 15-25, 32,40
	the whole document	

	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/032491

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HO H K ET AL: "Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention", JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 50, no. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 118-127, XP002560352, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/J.JHEP.2008.08.015 [retrieved on 2008-10-13] the whole document</p> <p>-----</p> <p>EP 1 918 376 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]) 7 May 2008 (2008-05-07) the whole document in particular pages 10-11</p> <p>-----</p>	31-41
Y		32, 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2012/032491

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010004204	A2	14-01-2010	AR 072699 A1 AU 2009267834 A1 CA 2730300 A1 CN 102149730 A DO P2011000005 A EA 201170155 A1 EC SP11010748 A EP 2315781 A2 FR 2933702 A1 JP 2011527322 A KR 20110028536 A MA 32547 B1 PE 03132011 A1 TW 201006492 A US 2011150903 A1 UY 31970 A WO 2010004204 A2	15-09-2010 14-01-2010 14-01-2010 10-08-2011 15-02-2011 30-08-2011 28-02-2011 04-05-2011 15-01-2010 27-10-2011 18-03-2011 01-08-2011 21-06-2011 16-02-2010 23-06-2011 26-02-2010 14-01-2010
WO 2010026291	A1	11-03-2010	AU 2009289136 A1 CA 2738034 A1 CN 102224170 A EP 2342230 A1 JP 2012501637 A US 2011212091 A1 WO 2010026291 A1	11-03-2010 11-03-2010 19-10-2011 13-07-2011 26-01-2012 01-09-2011 11-03-2010
WO 2008052796	A1	08-05-2008	AU 2007315211 A1 CA 2668295 A1 EP 2094733 A1 EP 2433966 A1 JP 2010508037 A US 2010169992 A1 WO 2008052796 A1	08-05-2008 08-05-2008 02-09-2009 28-03-2012 18-03-2010 01-07-2010 08-05-2008
WO 2005066211	A2	21-07-2005	AU 2004312376 A1 CA 2550245 A1 EP 1697420 A2 US 2007248605 A1 WO 2005066211 A2	21-07-2005 21-07-2005 06-09-2006 25-10-2007 21-07-2005
EP 1918376	A1	07-05-2008	AU 2007315213 A1 CA 2668027 A1 EP 1918376 A1 EP 2092066 A2 JP 2010508369 A US 2010143386 A1 WO 2008052798 A2	08-05-2008 08-05-2008 07-05-2008 25-08-2009 18-03-2010 10-06-2010 08-05-2008

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
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 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(72)発明者 デノワイエ, リュック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 7 , サン フランシスコ, クレアモント ブール
ヴァード 2 5 0

(72)発明者 フレンチ, ドロシー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 7 , サウス サン フランシスコ, ディーエヌエ
ー ウェイ 1 , ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA45 CA07 DA03 EA02 GA11 HA01
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA17 MA02 NA05 ZB262 ZC412
4C085 AA14 AA15 CC23 DD62 EE01 EE03
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 DA86 EA22 EA28
FA74