



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119110806 A

(43) 申请公布日 2024.12.10

(21) 申请号 202380031311.1

(22) 申请日 2023.03.28

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/083269 2022.03.28 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/084213 2023.03.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/185778 EN 2023.10.05

(71) 申请人 杭州中美华东制药有限公司

地址 310011 浙江省杭州市拱墅区莫干山路866号

(72) 发明人 周添添 杜庆林 韩淑华 彭菲  
杨雪艳

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/30 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

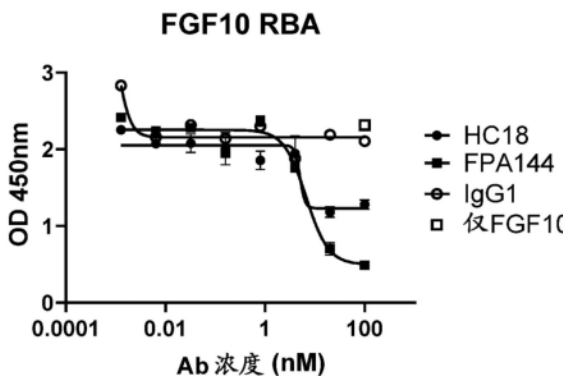
权利要求书3页 说明书25页  
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

新型抗FGFR2抗体

(57) 摘要

本公开涉及抗FGFR2b抗体或其抗原结合片段、编码其的核酸、包含其的药物组合物、其生产方法及其用途。



1. 一种特异性结合FGFR2b的抗体或其抗原结合片段,其包含:具有与SEQ ID NO:1至少80%同一性的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、具有与SEQ ID NO:2至少80%同一性的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与SEQ ID NO:3至少80%同一性的氨基酸序列的重链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其具有以下特性中的至少一种:

i) 对FGF10与FGFR2b结合的抑制作用弱;

ii) 检测不到的对FGFR2c的结合亲和力。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链CDR1;具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的轻链CDR2;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的轻链CDR3。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1,由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2,由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3;和由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1,由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2,和由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:7至少80%同一性的氨基酸序列的重链可变区;和具有与SEQ ID NO:8至少80%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

6. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的重链可变区;和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的轻链。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白恒定区,任选地人免疫球蛋白恒定区,或任选地人IgG、优选人IgG1的恒定区。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述恒定区包含一个或多个增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的修饰。

10. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其是无岩藻糖基化的。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、双抗体、三抗体、四抗体、Fab片段、F(Fab')<sub>2</sub>片段、scFv片段、Fv片段、Fab'片段或结构域抗体。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其能够抑制FGF诱导的FGFR2磷酸化和癌细胞增殖。

13. 一种抗体或其抗原结合片段,其与前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合FGFR2b。

14. 根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合FGFR2b上的表位,所述表位与包含分别具有SEQ ID NO:7和8所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段所识别的表位相同。

15. 一种核酸,其编码前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

16. 根据权利要求15所述的核酸,其包含:具有核苷酸序列SEQ ID NO:11的重链编码核

酸;和/或具有核苷酸序列SEQ ID NO:12的轻链编码核酸。

17. 一种表达载体,其包含权利要求15或16所述的核酸。

18. 一种宿主细胞,其包含权利要求17所述的表达载体。

19. 一种药物组合物,其包含:

(a) 权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、或权利要求17所述的表达载体,以及

(b) 药学上可接受的载体。

20. 一种抗体-药物缀合物,其包含与一个或多个缀合部分连接的权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

21. 一种产生根据权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养权利要求18所述的宿主细胞。

22. 权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、权利要求17所述的表达载体、权利要求18所述的宿主细胞、权利要求19所述的药物组合物、或权利要求20所述的抗体-药物缀合物在制备用于治疗受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症的药物中的用途。

23. 一种抑制或减少受试者中FGF诱导的肿瘤细胞增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、权利要求17所述的表达载体、权利要求18所述的宿主细胞、权利要求19所述的药物组合物、或权利要求20所述的抗体-药物缀合物。

24. 一种抑制或减少受试者中FGF诱导的FGFR2磷酸化的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、权利要求17所述的表达载体、权利要求18所述的宿主细胞、权利要求19所述的药物组合物、或权利要求20所述的抗体-药物缀合物。

25. 一种在受试者中杀死与FGFR2b异常表达相关的肿瘤细胞并降低角膜毒性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、权利要求17所述的表达载体、权利要求18所述的宿主细胞、权利要求19所述的药物组合物、或权利要求20所述的抗体-药物缀合物。

26. 一种治疗受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、权利要求17所述的表达载体、权利要求18所述的宿主细胞、权利要求19所述的药物组合物、或权利要求20所述的抗体-药物缀合物。

27. 根据权利要求22所述的用途或根据权利要求26所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症,并且任选地所述癌症的特征在于表达或过表达FGFR2b。

28. 根据权利要求22所述的用途或根据权利要求26所述的方法,其中所述疾病或病症是选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝细胞癌、肾细胞癌、头颈癌、间皮瘤、黑色素瘤、肉瘤、脑肿瘤、胃食管腺癌、恶性子宫肿瘤、胃食管连接处腺癌、胆管癌、肝内胆管癌和尿路上皮癌的疾病或病症。

29. 根据权利要求22所述的用途或根据权利要求26所述的方法,其中所述疾病或病症

是胃癌。

30. 根据权利要求22所述的用途或根据权利要求26所述的方法,其中所述疾病或病症是FGFR2阳性的胃癌。

31. 根据权利要求23-26中任一项所述的方法,其中权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15或16所述的核酸、权利要求17所述的表达载体、权利要求18所述的宿主细胞、权利要求19所述的药物组合物、或权利要求20所述的抗体-药物缀合物与至少一种另外的治疗剂依次或同时施用。

32. 一种试剂盒,其包含权利要求1-14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

## 新型抗FGFR2抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及特异性结合FGFR2b的抗体或其抗原结合片段、其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 是跨膜酪氨酸激酶受体,通过激活下游PI3K-AKT和MAPK-ERK通路调节许多基本生物过程,包括胚胎发生、组织和干细胞维持、血管生成和伤口愈合 (Beenken and Mohammadi, 2009; Katoh and Katoh, 2006; Turner and Grose, 2010)。FGFR家族由4种受体 (FGFR1至FGFR4) 组成,对应22种配体 (FGF) (Korc and Friesel, 2009)。FGFR2信号传导通路失调会导致基因扩增和蛋白质过表达,从而导致肿瘤发生和预后不良 (Grose and Dickson, 2005)。剪接变异产生几种受体变体,包括2种主要的FGFR2同种型,称为FGFR2b和FGFR2c (也称为FGFR2IIIb和FGFR2IIIc)。每种同种型的表达通常仅限于特定组织。具体来说,FGFR2b的3个主要配体是FGF7、FGF10和FGF22,通常在上皮细胞中表达,而FGFR2c在间充质组织中表达 (Ornitz et al., 1996; Zhang et al., 2006)。在FGFR2扩增的胃癌中,FGFR2b同种型占主导地位。

[0003] 在之前的研究中,FGFR2b在2.5%-31.1%的胃食管腺癌 (GEA) 中过表达,具体取决于所使用的抗体和检测方法 (Ahn et al., 2016; Angal et al., 1993; Nagatsuma et al., 2015)。Bemarituzumab (FPA144) 是一种FGFR2b特异的人源化无岩藻糖基化免疫球蛋白G1单克隆抗体,其通过竞争性结合抑制FGF来阻断FGFR2b信号传导,并针对FGFR2b过表达的肿瘤细胞引发增强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) (Xiang et al., 2021)。Bemarituzumab在临床前表现出显著的抗肿瘤活性,并在I期临床试验中显示出积极的疗效 (Catenacci et al., 2020; Xiang et al., 2021)。然而,28名患者中有3名 (10.7%) 报告接受高剂量时出现角膜毒性 (Catenacci et al., 2020)。角膜毒性的机理被认为是由于抑制了参与调节角膜上皮伤口愈合的FGF10 (Itoh, 2016)。在之前的体内研究中,在炎症诱发的兔干眼模型中检查了FGF10的治疗效果,表明FGF10在角膜上皮细胞愈合中的作用 (Zheng et al., 2015)。迫切需要降低角膜毒性而不影响抗肿瘤活性的抗FGFR2b抗体。

[0004] 为了开发一种具有低角膜毒性的新型抗FGFR2b抗体,以满足尚未满足的临床需求,我们生成了针对FGFR2b的特异性抗体,其表现出显著的肿瘤抑制能力,但FGF10抑制能力低,意味着低的临床不良事件。

### 发明内容

[0005] 在一个方面,本公开提供了特异性结合FGFR2b的抗体或其抗原结合片段,其包含:具有与SEQ ID NO:1至少80%同一性的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、具有与SEQ ID NO:2至少80%同一性的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有与SEQ ID NO:3至少80%同一性的氨基酸序列的重链CDR3。

[0006] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有以下特性中的至少一种:

[0007] i) 对FGF10与FGFR2b结合的抑制作用弱;

[0008] ii) 检测不到的对FGFR2c的结合亲和力。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链CDR1;具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的轻链CDR2;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的轻链CDR3。

[0010] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1,由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2,由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3;和由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1,由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2,和由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

[0011] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含具有与SEQ ID NO:7至少80%同一性的氨基酸序列的重链可变区;和具有与SEQ ID NO:8至少80%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的重链可变区;和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的轻链。

[0014] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白恒定区,任选地人免疫球蛋白的恒定区,或任选地人IgG的恒定区。在优选实施方案中,恒定区源自人IgG1。

[0015] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段的恒定区包含一个或多个增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的修饰。

[0016] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段是无岩藻糖基化的。

[0017] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、双抗体、三抗体、四抗体、Fab片段、F(Fab')<sub>2</sub>片段、scFv片段、Fv片段、Fab'片段或结构域抗体。

[0018] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段能够抑制FGFR2磷酸化和FGF诱导的癌细胞增殖。

[0019] 另一方面,本公开提供了与如上所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合FGFR2b的抗体或其抗原结合片段。

[0020] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合FGFR2b上的相同表位,所述表位被包含分别具有SEQ ID NO:7和8所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段识别。

[0021] 另一方面,本公开提供了编码本文所提供的抗体或其抗原结合片段的核酸。

[0022] 在一些实施方案中,所述核酸包括:具有核苷酸序列SEQ ID NO:11的重链编码核酸;和/或具有核苷酸序列SEQ ID NO:12的轻链编码核酸。

[0023] 另一方面,本公开提供了包含本文提供的核酸的表达载体。

[0024] 另一方面,本公开提供了包含本文提供的表达载体的宿主细胞。

[0025] 另一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含:

[0026] (a) 本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、或本文提供的表达载

体,和

[0027] (b) 药学上可接受的载体。

[0028] 在另一方面,本公开提供了抗体-药物缀合物,其包含连接至一个或多个缀合部分上的本文提供的抗体或其抗原结合片段。

[0029] 在另一方面,本公开提供了产生本文提供的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在允许抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养本文提供的宿主细胞。

[0030] 在另一方面,本公开提供了本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、本文提供的宿主细胞、本文提供的药物组合物、或本文提供的抗体-药物缀合物在制备用于治疗受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症的药物中的用途。

[0031] 在另一方面,本公开提供了抑制或减少受试者中FGF诱导的肿瘤细胞增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、本文提供的宿主细胞、或本文提供的药物组合物、或本文提供的抗体-药物缀合物。

[0032] 在另一方面,本公开提供了抑制或减少受试者中FGF诱导的FGFR2磷酸化的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、本文提供的宿主细胞、本文提供的药物组合物、或本文提供的抗体-药物缀合物。

[0033] 在另一方面,本公开提供了在受试者中杀死与FGFR2b异常表达相关的肿瘤细胞并降低角膜毒性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、本文提供的宿主细胞、本文提供的药物组合物、或本文提供的抗体-药物缀合物。

[0034] 在另一方面,本公开提供了治疗受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、本文提供的宿主细胞、本文提供的药物组合物、或本文提供的抗体-药物缀合物。

[0035] 在一些实施方案中,如上所述的疾病或病症是癌症,并且任选地所述癌症的特征在于表达或过表达FGFR2b。在优选的实施方案中,所述癌症的特征在于表达或过表达FGFR2b。

[0036] 图1抗FGFR2b抗体与不同FGFR2同种型的结合。图1A显示HC18特异性地与表达hFGFR2b的CHOK1细胞结合。图1B显示HC18不与表达hFGFR2c的CHOK1细胞结合。

[0037] 图2抗FGFR2b抗体对FGFR2b与其配体结合的抑制。图2A显示HC18显著抑制FGF7与FGFR2b的结合。图2B显示HC18部分抑制FGF10与FGFR2b的结合。

[0038] 在另一方面,本公开提供了包含本文提供的抗体或其抗原结合片段的试剂盒。在优选的实施方案中,根据本公开的试剂盒还包含用于指导使用本公开的抗体或其抗原结合片段的说明书,例如用于治疗或预防受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症,例如癌症。

[0039] 本文将更详细地描述这些方面和其他方面。所提供的每个方面可以包括本文所提供的多种实施方案。因此,预期所描述的每个方面可以包括涉及元素或元素组合的每个实

施方案,并且所有此类方面和实施方案的组合都被明确考虑在内。

### 附图说明

[0040] 图5抗FGFR2b抗体和阴性对照hIgG1对SNU-16细胞的FGF7(图5A)和FGF10(图5B)诱导的FGFR2磷酸化的抑制。

[0041] 图5抗FGFR2b抗体和阴性对照hIgG1对SNU-16细胞的FGF7(图5A)和FGF10(图5B)诱导的FGFR2磷酸化的抑制。

[0042] 图3抗FGFR2b抗体与人FGFR2b抗原结合的表面等离子体响应(SPR)传感图。

[0043] 图4使用用抗FGFR2b抗体诱导PBMC作为效应细胞,以及表达全长人类FGFR2bBa/F3细胞的靶细胞(E:T=20:1),进行ADCC(抗体依赖性细胞毒性)生物测定。

[0044] 图5抗FGFR2b抗体和阴性对照hIgG1对SNU-16细胞的FGF7(图5A)和FGF10(图5B)诱导的FGFR2磷酸化的抑制。

[0045] 图6抗FGFR2b抗体和阴性对照hIgG1对SNU-16细胞的FGF7(图6A)和FGF10(图6B)诱导的ERK1/2磷酸化的抑制。

[0046] 图7抗FGFR2b抗体和阴性对照hIgG1对SNU-16细胞的FGF7诱导的增殖的抑制。

### 具体实施方式

[0047] 除非本文另有定义,本文中使用的科学技术术语应当具有本领域技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有明确说明,单数术语旨在包括复数术语,反之亦然。为了便于阅读本申请,下面对一些术语进行定义。

[0048] 定义

[0049] 如本文所用,不定冠词“a”或“an”应理解为指代任何所述或所列举的组分的“一个或多个”。

[0050] 本文中使用的术语“约”在用于数值时,是指合理接近所述值并且在本领域技术人员确定的可接受的误差范围内的值,这将部分取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。例如,“约”可以表示所述参考值加或减50%的范围,优选地加或减25%的范围,或更优选地加或减10%的范围。当申请中提供具体数值时,“约”的含义,除非另有说明,应理解为根据本领域的实践在该具体数值的可接受的误差范围内。

[0051] “抗体”(Ab)应包括但不限于与抗原特异性结合且包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白免疫球蛋白(Ig),或其抗原结合片段。每条H链包含一个重链可变区(本文缩写为 $V_H$ )和一个重链恒定区。IgG Ab的重链恒定区包含三个恒定结构域, $CH_1$ 、 $CH_2$ 和 $CH_3$ 。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为 $V_L$ )和轻链恒定区。IgG Ab的轻链恒定区包含一个恒定结构域, $C_L$ 。 $V_H$ 和 $V_L$ 区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区,称为框架区(FR)。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 包含3个CDR(轻链CDR包括LCDR1、LCDR2和LCDR3,重链CDR包括HCDR1、HCDR2、HCDR3)和4个FR,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。已经使用了多种方法来描绘Ab内的CDR结构域,包括Rabat、Chothia、AbM、contact和IMGT定义。除非特别说明,本公开默认使用Kabat编号。Ab的恒定区可介导Ig与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一

组分(C1q)。抗体根据其重链恒定区的氨基酸序列分类。抗体的五大类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。几种主要抗体类别又分为亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2。

[0052] 本文中使用的术语“抗体”包括与特定抗原结合的任何免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、二价抗体、单价抗体、多特异性抗体、双特异性抗体。可以使用完整抗体或具有抗体的抗原结合部分的抗体片段。本文中使用的术语“抗原结合片段”是指由完整抗体的一部分形成的抗体片段,其包含一个或多个CDR;或任何其他可以结合抗原但不包含完整的天然抗体结构的抗体片段。本文中使用的术语“抗体或其抗原结合片段”是指具有抗原结合部分的完整抗体或抗体片段。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学裂解产生。抗体或其抗原结合片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体(dAb)、包含互补决定区(CDR)的片段、单链可变片段(scFv)、嵌合抗体、双抗体、三抗体、四抗体和含有至少一部分免疫球蛋白的多肽,其足以赋予对多肽的特异性抗原结合。

[0053] “Fab片段”是具有V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>和CH<sub>1</sub>结构域的单价片段。“F(ab')<sub>2</sub>片段”是具有两个通过二硫键在铰链区连接的Fab片段的二价片段。“Fv片段”具有来自抗体单臂的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域。“结构域抗体(dAb)”由V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域组成。“单链可变片段(scFv)”是一种抗体,其中V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区通过接头(例如,合成的氨基酸残基序列)连接形成连续的蛋白质链,其中接头的长度足以使蛋白质链形成单价抗原结合位点。术语“双抗体”是包含两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包含通过接头连接的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域,该接头太短以至于同一链上的两个结构域无法配对,从而允许每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对。如果双抗体的两条多肽链相同,则得到的双抗体将具有两个相同的抗原结合位点。具有不同序列的多肽链可用于产生具有两个不同抗原结合位点的双抗体或双特异性抗体。双抗体或双特异性抗体也指具有来自两个不同单克隆抗体的片段并能够结合两个不同表位的人工抗体或抗原结合片段。这两个表位可存在于同一抗原上,也可存在于两种不同的抗原上。类似地,三抗体、四抗体或其他多特异性抗体是包含三条、四条或多条可以相同或不同的多肽链的抗体,从而分别形成三个、四个或多个可以相同或不同的抗原结合位点。

[0054] 本文使用的术语“人”Ab是指具有可变区的Ab,其中框架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列。此外,如果Ab含有恒定区,则该恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。

[0055] 本文中使用的术语“人源化”Ab是指一种Ab,其中非人Ab CDR结构域之外的一些、大多数或全部氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应氨基酸取代。在人源化形式Ab的一个实施方案中,CDR结构域之外的一些、大多数或全部氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸取代,而一个或多个CDR区内的一些、大多数或全部氨基酸保持不变。只要不影响Ab结合特定抗原的能力,氨基酸的少量添加、删除、插入、取代或修饰都是允许的。“人源化”Ab保留了与原始Ab相似的抗原特异性。

[0056] 本文中使用的术语“单克隆”Ab(mAb)是指单分子组成的非天然存在的Ab分子制品,即其一级序列基本相同且对特定表位表现出单一结合特异性和亲和力的Ab分子。MAb可以通过杂交瘤、重组、转基因或本领域技术人员已知的其他技术来生产。

[0057] 本文中使用的术语“嵌合”Ab是指可变区来源于一个物种而恒定区来源于另一个物种的Ab,例如可变区来源于小鼠Ab而恒定区来源于人Ab的Ab。在一个示例性实施例中,嵌合抗体可包含来自人的恒定区和来自非人动物(例如小鼠)的可变区。在一些实施方案中,

非人动物是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。

[0058] 本文中使用的术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指两个分子之间的非随机结合反应,例如抗体和抗原之间的结合反应。本文提供的抗体和抗原结合片段的结合亲和力可以用 $K_D$ 值表示,其表示抗原和抗原结合分子(例如抗体和抗原结合片段)之间的结合达到平衡时,解离速率与结合速率之比( $k_{off}/k_{on}$ )。抗原结合亲和力(例如 $K_D$ )可以使用本领域已知的适当方法(包括例如Biacore技术、Kinexa技术和流式细胞术)来适当地确定。

[0059] 本文中使用的术语“竞争结合”是指抗体或抗原结合片段抑制两种分子(例如人FGFR2b和抗FGFR2b抗体)之间的结合相互作用至任何可检测的程度(例如至少85%、或至少90%、或至少95%)的能力。本领域技术人员将认识到,无需过度实验就可以确定给定抗体是否与本公开的抗体竞争与FGFR 2b的结合。

[0060] 本文中使用的术语“表位”是指与抗体或抗原结合部分结合的抗原上的特定原子组或氨基酸组。表位的最小尺寸可以为约三、四、五、六或七个氨基酸,但这些氨基酸不需要位于抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于基于抗原的二级和三级结构的抗原的三维构型。CDR对于识别抗原表位很重要。

[0061] 本文中使用的氨基酸序列(或核酸序列)的“百分比(%)同一性”定义为:在比对序列后,候选序列中氨基酸(或核酸)残基与参考序列中氨基酸(或核酸)残基相同的百分比。序列同一性是指所比较的两个序列的核苷酸或氨基酸之间的精确匹配。序列同一性可以由本领域技术人员通过常规方法确定,例如BLAST算法。

[0062] 本文中使用的“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(“ADCC”)是指体外或体内细胞介导的细胞毒性,其中在效应细胞表面表达Fc受体(FcR)的非特异性效应细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)识别与靶细胞上的表面抗原结合的Ab的Fc区并主动裂解靶细胞。原则上,任何具有激活FcR的效应细胞都可以被触发来介导ADCC。Ab的ADCC活性可以如实施例5所述测量,或者通过本领域技术人员已知的任何方法来测量。

[0063] 如本文所用,修饰的Ab包含一个或多个“增强ADCC”的修饰,是指修饰的Ab的ADCC活性水平高于未修饰的Ab诱导的ADCC。例如,本公开中描述的增强的ADCC的特征在于,FGFR2b表达细胞的裂解至少高约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约60%、约65%、约70%或约75%。现有技术中已经描述了用于增强ADCC的各种方法(Liu R, Oldham RJ, Teal E, Beers SA, Cragg MS. *Antibodies* (Basel). 2020 Nov 17; 9(4):64)。例如,研究表明,无岩藻糖基化(即岩藻糖缺乏或非岩藻糖基化)抗体表现出与Fc $\gamma$ RIII的结合增加,从而激发更高的ADCC活性(Shields等人(2002) *J. Biol. Chem.*, 277: 26733-26740; Shinkawa等人(2003) *J. Biol. Chem.*, 278: 3466-3473; 和欧洲专利申请公开号1176195)。在一些实施方案中,本文提供的无岩藻糖基化抗体缺少重链天冬酰胺297(Asn297)处的岩藻糖。Asn297(Fc区残基的Eu编号;或Kabat编号中的第314位)是在IgG1同型抗体Fc区的每个CH<sub>2</sub>结构域中发现的保守N-连接糖基化位点。

[0064] 如本文所用,“施用”、“施加”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种,将包含治疗剂的组合物物理引入受试者。治疗性抗体的优选施用途径是静脉内(IV)施用。其他施用途径包括皮下(SC)、腹膜内(IP)、肌肉内(IM)、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。本文所用的短语“肠胃外施用”是指除肠道和局部施用

之外的施用方式,通常通过注射施用,包括但不限于静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。或者,根据本公开的抗体或其抗原结合片段可以通过非肠胃外途径施用,例如局部、表皮或粘膜途径施用,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。例如,施用还可进行一次、多次和/或在一个或多个延长的时间段内进行。

[0065] 本文使用的术语“成纤维细胞生长因子受体2 (FGFR2)”,也称为CD332 (分化簇332),是FGFR家族的一个成员,在人中由位于10号染色体上的FGFR2基因编码。FGFR高度保守,具有共同的结构特征,由细胞外配体结合部分(所述细胞外配体结合部分由不同的Ig样结构域组成; $\alpha$ 同种型包含所有三个Ig样结构域D1、D2和D3; $\beta$ 同种型仅包含两个Ig样结构域D2和D3结构域,但不包含D1)、跨膜结构域和细胞内酪氨酸激酶催化结构域组成。FGFR2具有两种天然存在的同种型,FGFR2IIIb和FGFR2IIIc,通过第三免疫球蛋白样结构域(D3)剪接而成。FGFR2IIIb是FGF1的高亲和力受体,并且是KGF家族成员(例如,FGF10、FGF22,尤其是FGF7)的特异性受体。发现KGF (FGF7) 和KGF (FGFR2IIIb) 在多种癌症中异常表达,例如胰腺癌、胃癌、卵巢癌和乳腺癌(Helsten T, Elkin S, Arthur E, Tomson BN, Carter J, Kurzrock R. Clin Cancer Res. 2016 Jan 1; 22(1):259-67)。

[0066] 本文中使用的“FGFR2b的异常表达”包括但不限于FGFR2b突变、FGFR2b扩增、FGFR2b融合、FGFR2易位和FGFR2过表达。

[0067] 本文中使用的“抗FGFR2b抗体”是指能够特异性结合人或非人FGFR2b(例如UniProt数据库中公开为UniProtKB-P21802-3、UniProtKB-A0A2K5TL84、UniProtKB-P21803-2的蛋白质)的抗体。在一些实施方案中,抗FGFR2b抗体可以特异性地结合FGFR2b,其结合亲和力( $K_D$ )小于 $1 \times 10^{-4}M$ 、小于 $1 \times 10^{-5}M$ 、小于 $1 \times 10^{-6}M$ 、小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 、或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。在一些实施方案中,抗FGFR2b抗体可以特异性地结合FGFR2b,其 $K_D$ 小于50nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、或1nM。在优选实施方案中,抗FGFR2b抗体特异性结合FGFR2b,其结合亲和力( $K_D$ )小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 、或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。

[0068] 本文使用的术语“癌症(cancer)”是指一大类以体内异常细胞不受控制的生长为特征的疾病。失调的细胞分裂和生长会导致恶性肿瘤的形成,恶性肿瘤会侵入邻近组织,也可能通过淋巴系统或血液转移到身体的远处。该术语旨在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化细胞、组织或器官,无论组织病理学类型或侵袭阶段如何。本文中使用的术语“肿瘤”是指癌细胞,例如大量癌细胞。可以使用本文所述方法治疗或诊断的癌症包括各种器官系统的恶性肿瘤,例如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴、胃肠道和泌尿生殖道的恶性肿瘤,以及腺癌,其包括恶性肿瘤,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段被设计用于治疗或诊断受试者的癌症。术语“癌(carcinoma)”是本领域公认的,是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是肾癌或黑色素瘤。示例性的癌包括由宫颈、肺、前列腺、乳腺、头颈、结肠和卵巢组织形成的癌。该术语还包括癌肉瘤,例如,其包括由癌组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指源自腺组织或肿

瘤细胞形成可识别腺状结构的癌。术语“肉瘤”是公认的,是指间叶衍生的恶性肿瘤。

[0069] 本文中使用的“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猴子、黑猩猩、大猩猩;以及啮齿动物,例如小鼠、大鼠和豚鼠。在优选的实施方案中,受试者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0070] 本文中使用的“载体”是指多核苷酸分子,其能够复制/克隆其中包含的所需核酸片段、或能够表达由引入到适当的细胞宿主中的此类所需核酸片段编码的蛋白质。载体的示例包括克隆载体和表达载体。本文使用的术语“表达载体”是指可以操作性地插入编码蛋白质的多核苷酸以实现该蛋白质表达的载体。表达载体可含有多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件和报告基因。此外,载体可含有复制起点。载体可以通过本领域已知的方法引入宿主细胞,例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染、以及感染和/或转导(例如用重组病毒)。载体的非限制性示例包括病毒载体(可用于产生重组病毒)、裸露的DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体、以及与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0071] 本文中使用的“宿主细胞”是指已经被核酸序列转化或者能够被核酸序列转化,从而表达目标基因的细胞。宿主细胞可以是原核细胞(例如大肠杆菌)、真核细胞(例如酵母、植物包括烟草和番茄、动物包括人、猴子、仓鼠、大鼠、小鼠或昆虫)、或杂交瘤。

[0072] 本文所用的药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时,能够保护受试者免于疾病发作或促进受试者疾病消退的药物或治疗剂的任意量,所述促进疾病消退表现为疾病症状严重程度的降低、无疾病症状期的频率和持续时间的增加、因疾病折磨而导致的损伤或残疾的预防或减轻、或者疾病症状的缓解。此外,关于治疗的术语“有效”和“有效性”包括药理有效性和生理安全性。药理有效性是指药物促进患者中疾病消退(例如癌症消退)的能力。生理安全性是指施用药物后在细胞、器官和/或生物体水平上产生的可接受水平的毒性或其他不良生理作用(副作用)。可以使用专业人员已知的多种方法来评估治疗剂的功效,例如在临床试验期间对人受试者进行评估、在预测人功效的动物模型系统中进行评估、或通过体外测定来检测药物的活性。

[0073] 本文中使用的术语“有效的抑制”是指本公开的抗体或其抗原结合片段与参考抗体相比具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%的相对抑制率。术语“弱抑制”是指本公开的抗体或其抗原结合片段与参考抗体相比,具有至多约65%、至多约60%、至多约55%、至多约50%、至多约45%、至多约40%的相对抑制率。在一些实施方案中,抗FGFR2b参考抗体是FPA144。在一些优选的实施方案中,术语“有效的抑制”是指本公开的抗体或其抗原结合片段与参考抗体FPA144相比具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%的相对抑制率。在一些优选的实施方案中,术语“弱抑制”是指本公开的抗体或其抗原结合片段与参考抗体FPA144相比,具有至多约55%、至多约50%、至多约45%、至多约40%的相对抑制率。

[0074] 如本文所用,本文使用的术语疾病或病症的“治疗”包括预防或缓解病症、减缓病症的发作或发展速度、降低罹患病症的风险、预防或延迟与病症相关的症状的发展、减轻或终止与病症相关的症状、使病症完全或部分消退、治愈病症、或其某些组合。

[0075] 本文中使用的术语“药学上可接受的载体”表示指定的载体、载剂、稀释剂、赋形剂

和/或盐通常在化学和/或物理上与制剂中包含的其他成分相容,并且在生理上与其接受者相容。

[0076] 抗FGFR2b抗体和抗原结合片段

[0077] 本公开提供了新型抗FGFR2b抗体(例如,HC18)或其抗原结合片段,其特异性地结合FGFR2b,例如在细胞表面表达的人FGFR2b,但是对FGFR2c不具有可检测的结合亲和力。此外,本公开的抗体或其抗原结合片段介导对FGF7与FGFR2b结合的有效抑制,但对FGF10与FGFR2b结合的抑制弱,这提供了改善的安全性/有效性平衡。

[0078] 实验表明,本文提供的抗体通过抑制FGF7诱导的FGFR2b和ERK1/2磷酸化表现出对FGF7-FGFR2b通路和肿瘤细胞增殖(例如SNU-16细胞)的显著阻断,而与基准(例如FPA144)相比,对FGF10与FGFR2b结合的阻断作用相对较弱,提示其在角膜毒性方面可能具有更好的安全性。ADCC功能测定表明,本公开的抗体诱导了强的ADCC作用,杀死了表达FGFR2b的肿瘤细胞。

[0079] 本文提供的抗体或其抗原结合片段包含:具有与SEQ ID NO:1至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或与SEQ ID NO:1相比具有至多1个氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1);具有与SEQ ID NO:2至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或与SEQ ID NO:2相比具有至多3个(例如1、2或3个)氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列的重链CDR2;和具有与SEQ ID NO:3至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或与SEQ ID NO:3相比具有至多1个氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列的重链CDR3。

[0080] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:具有与SEQ ID NO:4至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或与SEQ ID NO:4相比具有至多2个(例如1或2个)氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列的轻链CDR1;具有与SEQ ID NO:5至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或与SEQ ID NO:5相比具有至多1个氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列的轻链CDR2;以及具有与SEQ ID NO:6至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或与SEQ ID NO:6相比具有至多1个氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0081] 在优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的重链CDR1;具有氨基酸序列SEQ ID NO:2的重链CDR2;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:3的重链CDR3。

[0082] 在优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链CDR1;具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的轻链CDR2;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的轻链CDR3。

[0083] 在优选的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含HC18的CDR序列(见表1)。

[0084] 表1HC18的CDR序列。

[0085]	<b>HCDR1</b>	<b>HCDR2</b>	<b>HCDR3</b>
	<b>SEQ ID NO: 1</b>	<b>SEQ ID NO: 2</b>	<b>SEQ ID NO: 3</b>
	<b>SYWMH</b>	<b>SIYPENS DTSYNQKFKG</b>	<b>YHGYDGDY</b>
	<b>LCDR1</b>	<b>LCDR2</b>	<b>LCDR3</b>
	<b>SEQ ID NO: 4</b>	<b>SEQ ID NO: 5</b>	<b>SEQ ID NO: 6</b>
	<b>SASSSVSYMY</b>	<b>STSNLAS</b>	<b>QQRSSYPYT</b>

[0086] 在一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1,由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2,由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3;由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1,由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2,和由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

[0087] 已知CDR负责抗原结合,然而,已发现并非所有六个CDR都是不可缺少或不可改变的。换句话说,可以替换或改变或修饰HC18中的一个或多个CDR,但基本保留对FGFR2b的特定结合亲和力。

[0088] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可包含表1中提供的一个或多个CDR区中的一个或多个修饰或取代。此类变体保留了其亲本抗体对FGFR2b的特定结合亲和力,但可具有一种或多种特性的改进,例如更高的抗原结合亲和力或降低的糖基化可能性。

[0089] 在一些实施方案中,可以修饰本文提供的抗体或其抗原结合片段以去除CDR区内(或可变区内)的一个或多个Asn或Asp热点。这样的Asn和Asp热点可导致抗体降解,从而降低抗体的稳定性。

[0090] 在一些实施方案中,一个或多个修饰或取代是保守取代。

[0091] 本文提供的抗体或其抗原结合片段还包含合适的框架区(FR)序列,只要该抗体能够特异性地结合FGFR2b。表1中提供的CDR序列是从小鼠抗体获得的,但它们可以使用本领域已知的适当方法(例如重组技术)移植到任何适当物种(例如小鼠、人、大鼠、兔等)的任何适当FR序列上。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0092] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:7(即HC18的重链可变区)至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性、或与SEQ ID NO:7相比具有至多20个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列;所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:8(即HC18的轻链可变区)至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性、或与SEQ ID NO:8相比具有至多20个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列。在优选的实施方案中,取代是保守取代。

[0093] 在优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的重链可变区;和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

[0094] 本文提供的抗体或其抗原结合片段还包含免疫球蛋白恒定区,任选地人免疫球蛋白恒定区,任选地人IgG恒定区。在一些实施方案中,免疫球蛋白恒定区包含重链和/或轻链恒定区。重链恒定区包含CH<sub>1</sub>、铰链区和/或CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>区。在一些实施方案中,重链恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,轻链恒定区包含C<sub>κ</sub>或C<sub>λ</sub>。在优选的实施方案中,恒定区源自人IgG1 (hIgG1)。在优选的实施方案中,恒定区是人IgG1的恒定区。

[0095] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段包含至少一条重链和/或至少一条轻链。在一个实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:9(即HC18的全长重链序列)至少85% (例如至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性、或与SEQ ID NO:9相比具有至多50个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50个)氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列。在一个实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:10(即HC18的全长轻链序列)至少85% (例如至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性、或与SEQ ID NO:10相比具有至多50个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50个)氨基酸添加、取代和/或缺失的氨基酸序列。在优选的实施方案中,取代是保守取代。

[0096] 在优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链;和具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的轻链。

[0097] 表2显示了HC18的氨基酸序列和核苷酸序列。

[0098] 表2HC18的氨基酸序列和核苷酸序列。

[0099]

HC18	序列
------	----

<p>V<sub>H</sub> (SEQ ID No:7)</p>	<p>EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGSIYPENS DTSYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYMDLSSLTNE DSAVYYCSIHGYDGDYWGQGTTLVSS</p>
<p>V<sub>L</sub> (SEQ ID No:8)</p>	<p>QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLEIK</p>
<p>全长重链 (SEQ ID No: 9)</p>	<p>EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGSIYPENS DTSYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYMDLSSLTNE DSAVYYCSIHGYDGDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>全长轻链 (SEQ ID No: 10)</p>	<p>QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>编码重链全长序列的核苷酸序列 (SEQ ID No:11)</p>	<p>GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGGACAGTGCTGGCCAGACCAGGAGCAAGCGTGAAGATGAGCTGTAAGACAAGCGGGTACACATTCAAGCTATTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGACCCGGCCAAGGCCTGGAGTGGATCGGGAGCATCTACCCCGAGAACAGCGATAACAAGCTACAACCAGAAATCAAGGGCAAGGCCAAGCTGACCGCCGTGACCAGCGCCAGCACCGCATAACATGGACCTGAGCAGCCTGACCAACGAGGACAGCGCAGTGTACTACTGCAGCATCTACCACGGCTACGACGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGCCTTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGTCAAGTCAAGGTCTCCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC</p>

[0100]

	<p>AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAATGATTCTAGA</p>
<p>[0101] 编码轻链全长序列的核苷酸序列 (SEQ ID No:12)</p>	<p>CAGATCGTCCTCACCCAAAGCCCCGCCATAATGAGCGCCAGCCC CGGCGAAAAAGTCACCATCACCTGCAGCGCAAGCAGCAGCGTCA GCTACATGTACTGGTTCCAACAAAAACCCGGCACCAGTCCCAAAC TCTGGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCAAGCGGCGTGCCCGCC AGATTCAGTGGCAGTGGAAGCGGAACCTCCTACAGCCTCACCAT CAGCAGAAATGGAGGCCGAAGACGCAGCCACCTACTACTGCCAGC AGAGAAGCAGCTACCCATATACCTTCGGAGGCGGGACCAAGCTG GAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTGATTCTAGA</p>

[0102] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可以在本文提供的一个或多个序列中包含一个或多个修饰或取代,但仍保留对FGFR2b的特定结合亲和力。可以使用本领域已知的各种方法来实现该目的。例如,可以使用计算机软件虚拟模拟抗体与FGFR2b的结合,并识别抗体上形成结合界面的氨基酸残基。可以在取代中避免此类残基,以防止结合亲和力的降低,或者针对性地进行取代,以提供更强的结合。

[0103] 本文使用的“保守修饰变体”或“保守取代”是指用具有相似特征(例如,电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其他氨基酸取代蛋白质中的氨基酸,使得通常可以在不改变蛋白质的生物活性的情况下进行改变。本领域技术人员将认识到,一般而言,多肽非必需区的单个氨基酸取代不会显著改变生物活性(参见例如Watson等人(1987)Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,p.224(第4版))。此外,结构和/或功能相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物活性。根据本公开的抗体或其抗原结合片段的各种实施方案包括多肽链,其序列与本文公开的特定氨基酸序列(例如SEQ ID NO:7、8、9或10)相比包括至多0(无变化)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50个或更多个保守氨基酸取代。如本文所用,短语“至多X”保守氨基酸取代包括0个取代和至多X(包括X)个取代的任意数量的取代。此类示例性取代优选按照下表所示进行:

[0104] 表3示例性的保守氨基酸取代

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly;Ser
Arg (R)	Lys;His
Asn (N)	Gln;His
Asp (D)	Glu;Asn
Cys (C)	Ser;Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp;Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn;Gln

Ile (I)	Leu;Val
Leu (L)	Ile;Val
Lys (K)	Arg;His
Met (M)	Leu;Ile;Tyr
Phe (F)	Tyr;Met;Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe
Tyr (Y)	Trp;Phe
Val (V)	Ile;Leu

[0106] 本公开还考虑了根据本公开的抗体或其抗原结合片段的功能保守变体。“功能保守变体”是蛋白质中一个或多个氨基酸残基发生改变,但不改变多肽的整体构象和功能的变体,包括但不限于用具有相似特性的氨基酸替换氨基酸。

[0107] 本文提供的抗体或其抗原结合片段还包含能够诱导效应功能的恒定区。在一些实施方案中,恒定区包含一个或多个增强抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的修饰。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是无岩藻糖基化的。

[0108] 在一些实施方案中,与野生型抗体或其抗原结合片段相比,无岩藻糖基化抗体可以增加抗体或其抗原结合片段的效应功能(例如,ADCC)至少或约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍。

[0109] 如上所述,本文中使用的“抗体或其抗原结合片段”是指完整抗体或具有抗原结合部分的抗体片段。各种类型的抗体或抗原结合片段是本领域已知的,并且可以基于本文提供的抗FGFR2b抗体(例如,HC18)的抗原结合部分进行开发。

[0110] 在一些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、双抗体、三抗体、四抗体、Fab片段、F (Fab') 2片段、scFv片段、Fv片段、Fab'片段或结构域抗体。

[0111] 在一些实施方案中,本文提供的抗原结合片段可以形成嵌合抗原受体 (CAR) 的一部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是如本文所述的单链可变片段 (scFv) 的融合物,与CD3-zeta跨膜和胞内结构域融合。在一些实施方案中,嵌合抗原受体还包括来自各种共刺激蛋白受体(例如,CD28、41BB、ICOS)的胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含多个信号传导结构域,例如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-0X40,以增加效力。因此,在一个方面,本公开进一步提供了表达如本文所述的嵌合抗原受体的细胞(例如,T细胞)。

[0112] 还考虑了与本文提供的抗体或其抗原结合片段(例如,HC18)竞争结合FGFR2b的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,这样的竞争性抗体特异性地结合与根据本公开的抗体或其抗原结合片段所结合的表位相同或重叠的表位。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合HC18识别的FGFR2b上的相同或重叠表位,所述HC18包含分别具有SEQ ID NO:7和8所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在与FPA144结合的表位不同的表位上特异性结合FGFR2b。在一些实施方

案中,抗体或抗原结合片段抑制人FGFR2b与抗FGFR2b抗体HC18之间的结合相互作用至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。本领域技术人员将认识到,无需过度实验就可以确定给定抗体是否与本公开的抗体竞争与FGFR2b的结合。

#### [0113] 抗体特征

[0114] 成纤维细胞生长因子受体2b (FGFR2b) 在约2-30%的GC中过表达,并且与较差的预后相关。Bemarituzumab是一种无岩藻糖基化的人源化单克隆抗体,特异性抑制FGFR2b。在FIGHT试验中,bemarituzumab在GC中表现出有益的反应,但似乎会导致高的角膜不良事件。有假说认为FGF10抑制可能是bemarituzumab导致角膜毒性的机制(Catenacci等人,J Clin Oncol.2020:38(21):2418-2426)。本公开提供了针对FGFR2b的新型抗体或其抗原结合片段,其对FGF10具有弱的抑制活性。因此,该抗体或其抗原结合片段可能代表一种具有减少眼睛副作用潜力的不同的抗体疗法。

[0115] 本文提供的抗体或其抗原结合片段至少具有下列特性之一:

[0116] 对FGFR2b具有特异性结合能力,对FGFR2c具有不可检测的结合亲和力,

[0117] 对FGF7与FGFR2b的结合具有有效的抑制作用,但对FGF10与FGFR2b的结合具有弱的抑制作用。

[0118] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段可以与FGFR2b结合,从而阻断该受体与其各自配体的相互作用;降低FGFR2的磷酸化;降低下游信号传导通路(例如MAPK通路、PI3K/AKT1/MTOR通路)的磷酸化;和/或通过ADCC和/或CDC直接杀死癌细胞。

[0119] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与人FGFR2b特异性结合,其结合亲和力( $K_D$ )小于 $1 \times 10^{-4}M$ 、小于 $1 \times 10^{-5}M$ 、小于 $1 \times 10^{-6}M$ 、小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 、或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。在一些实施方案中, $K_D$ 小于50nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、或1nM。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段以与阳性对照抗体(例如,FPA144)相当的结合亲和力( $K_D$ )特异性地结合人FGFR2b,例如,如通过表面等离子体共振测量的。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段具有与FPA144或FPA144类似物相比至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约80%、至少或约90%、至少或约100%、至少或约110%、至少或约120%、至少或约130%、至少或约140%、至少或约150%、至少或约200%的FGFR2b结合能力。

[0120] 在一个优选实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与人FGFR2b特异性结合,其结合亲和力( $K_D$ )小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。

[0121] 测量抗体对抗原的亲和力的一般技术包括例如ELISA、RIA和表面等离子体共振(SPR)。

[0122] 可采用ELISA测定或其他常用技术来测量抗FGFR2b抗体对FGF7和FGF10与FGFR2b结合的抑制。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与参考抗体(例如,FPA144)相比,具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%的对FGF7与FGFR2b结合的抑制作用的相对抑制率。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与参考抗体(例如,FPA144)相比,具有至多约65%、至多约60%、至多约55%、至多约50%、至多约45%或至多约40%的对FGF10与FGFR2b结合的抑制作用的相对抑制率。

[0123] 在一些优选的实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与参考抗体(例如

FPA144)相比,具有至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%的对FGF7与FGFR2b结合的抑制作用的相对抑制率,并且具有至多约55%、至多约50%、至多约45%或至多约40%的对FGF10与FGFR2b结合的抑制作用的相对抑制率。

[0124] 在一些实施方案中,与同种型对照抗体相比,本文提供的抗体或其抗原结合片段可以使补体依赖性细胞毒性(CDC)增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。

[0125] 在一些实施方案中,与同种型对照抗体相比,本文提供的抗体或其抗原结合片段可以使抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。

[0126] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段抑制FGF诱导的FGFR2磷酸化和癌细胞增殖。

[0127] 在一些实施方案中,与非特异性抗体或同种型对照抗体相比,本文提供的抗体或其抗原结合片段将细胞(例如,表达FGFR2b的细胞)中FGFR2的磷酸化(例如,FGF7诱导的磷酸化)水平降低至小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%或小于5%。在一些实施方案中,用所述抗体或其抗原结合片段治疗后,与用FPA144或FPA144类似物治疗后相比,包含磷酸化FGFR2的细胞的比例小于或约50%、小于或约60%、小于或约70%、小于或约80%、小于或约90%、小于或约100%、小于或约110%、小于或约120%、小于或约130%、小于或约140%、小于或约150%、小于或约200%。

[0128] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段降低参与癌细胞增殖、存活和/或凋亡的下游信号传导通路的磷酸化(例如,FGF7诱导的磷酸化)水平。在一些实施方案中,与非特异性抗体、同种型对照抗体相比,本文提供的抗体或其抗原结合片段将细胞(例如,表达FGFR2b的细胞)中ERK的磷酸化水平降低至小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%或小于5%。在一些实施方案中,与用FPA144或FPA144类似物处理的细胞相比,用所述抗体或其抗原结合片段处理的细胞(例如,表达FGFR2b的细胞)具有在总ERK中小于或约90%、小于或约80%、小于或约70%、小于或约60%、小于或约50%、小于或约40%、小于或约30%、小于或约20%、小于或约10%、小于或约5%的磷酸化ERK1/2的比率。

[0129] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与FPA144或FPA144类似物相比,具有较弱的降低细胞(例如,表达FGFR2b的细胞)中FGFR2的磷酸化(例如,FGF10诱导的磷酸化)水平的作用。

[0130] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段与FPA144或FPA144类似物相比,具有较弱的降低参与癌细胞增殖、存活和/或凋亡的下游信号传导通路的磷酸化(例如,FGF10诱导的磷酸化)水平的作用。

[0131] 在一些实施方案中,与非特异性抗体、同种型对照抗体相比,本文提供的抗体或其抗原结合片段将FGF7诱导的细胞(例如,表达FGFR2b的细胞)增殖降低至小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%或小于5%。

[0132] 缀合物

[0133] 本公开提供了抗体-药物缀合物,其包含与一个或多个缀合部分连接的抗体或其

抗原结合片段。

[0134] 在一些实施方案中,一个或多个缀合部分是稳定分子(例如,增加受试者或溶液中的抗体或其抗原结合片段的半衰期的分子)。稳定分子的非限制性示例包括:聚合物(例如,聚乙二醇)或蛋白质(例如,血清白蛋白,例如人血清白蛋白)。缀合稳定分子可以增加抗体或抗原结合片段在体外(例如在组织培养中或作为药物组合物储存时)或体内(例如在人体内)的半衰期或延长其生物活性。

[0135] 在一些实施方案中,一个或多个缀合部分是治疗剂。包含抗体或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物可以共价或非共价结合治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞抑制剂(例如,细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素、美登素类化合物(Maytansinoids)例如DM-1和DM-4、二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星、环磷酰胺及其类似物)。

[0136] 多核苷酸及其生产方法

[0137] 本公开还提供了编码本文提供的抗体或其抗原结合片段的核酸。

[0138] 本文中使用的术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限制,该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的多核苷酸,这些类似物具有与参考核酸相似的结合特性,并且以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另有说明,特定的多核苷酸序列还隐含地涵盖其保守修饰变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可通过生成其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(参见Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0139] 在一些实施方案中,编码抗体或其抗原结合片段的核酸包含:具有与SEQ ID NO:11至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核苷酸序列的重链编码核酸;和/或具有与SEQ ID NO:12至少80%(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核苷酸序列的轻链编码核酸。使用常规方法(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)可以很容易地分离和测序编码单克隆抗体的DNA。编码DNA也可以通过合成方法获得。

[0140] 可以使用本领域已知的重组技术将编码抗FGFR2b抗体的核酸(例如包括SEQ ID NO:11和12中所示的HC18序列)插入载体中,以便进一步克隆(扩增DNA)或表达。

[0141] 本文提供的抗体或其抗原结合片段可以通过本领域已知的任何蛋白质(例如抗体)合成方法来产生,尤其是通过化学合成或优选通过重组表达技术。

[0142] 抗体的重组表达需要构建含有编码该抗体的核酸的表达载体。一旦获得编码抗体的核酸,就可以通过重组DNA技术来产生用于产生该抗体的载体。在本公开中,构建了表达载体以含有抗体编码序列和适当的转录和翻译调控元件。这些方法包括但不限于体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。

[0143] 通过常规技术将表达载体转移到宿主细胞中,再通过常规技术培养转染的细胞,

即可产生根据本公开的抗体或其抗原结合片段。

[0144] 在一个实施方案中,产生根据本公开的抗体或其抗原结合片段的方法包括在允许抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养根据本公开的宿主细胞。在一个优选的实施方案中,该方法还包括从宿主细胞和/或培养基中回收和/或纯化所得的抗体或其抗原结合片段。

#### [0145] 药物组合物

[0146] 本公开提供了一种药物组合物,其包含本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、或本文提供的抗体-药物缀合物,以及一种或多种药学上可接受的载体。在优选实施方案中,所述药物组合物包含治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种额外的成分,例如药学上可接受的载体、载剂或介质。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的载体,可以包括例如药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性载剂、非水性载剂、抗菌剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮/分散剂、掩蔽剂或螯合剂、稀释剂、佐剂、赋形剂或无毒辅助物质、本领域已知的其他组分或其各种组合。

[0147] 在一些实施方案中,组合物可以包含无菌稀释剂(例如,无菌水或盐水)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂、抗菌剂或抗真菌剂(例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸或亚硫酸氢钠)、螯合剂(例如,乙二胺四乙酸)、缓冲剂(例如,醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐)和等渗剂,例如,糖(例如,葡萄糖)、多元醇(例如,甘露醇或山梨醇)或盐(例如,氯化钠)、或其任意组合。脂质体混悬液也可用作药学上可接受的载体(参见例如美国专利号4,522,811)。组合物的制剂可以配制并封装在安瓿瓶、一次性注射器或多剂量小瓶中。在需要时(例如在注射制剂中),可以通过使用涂层(如卵磷脂)或表面活性剂来保持适当的流动性。可以通过添加延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来延长抗体或其抗原结合片段的吸收。或者,可以通过植入物和微胶囊递送系统实现控制释放,其可以包括可生物降解、生物相容性的聚合物(例如乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸;Alza Corporation和Nova Pharmaceutical, Inc.)。

[0148] 药物组合物可以通过本领域技术人员已知的任何合适的方法施用,例如如上所述的肠胃外和非肠胃外方法。在一个优选的实施方案中,所述药物组合物可以通过静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外或胸骨内注射施用。

[0149] 本发明还提供了包含本文提供的抗体或其抗原结合片段的试剂盒。在优选的实施方案中,根据本公开的试剂盒还包含用于指导使用本公开的抗体或其抗原结合片段的说明书,例如用于治疗或预防受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病,例如癌症。

[0150] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、或本文提供的抗体-药物缀合物和至少一种另外的治疗剂在同一组合物中施用。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段、本文提供的核酸、本文提供的表达载体、或本文提供的抗体-药物缀合物和至少一种另外的治疗剂在两个不同的组合物中施用。

[0151] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包括一种或多种选自以下的抑制剂:B-Raf

抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、双重PI3K/mTOR抑制剂、布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)抑制剂、以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施方案中,另外的治疗剂是吡啶胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)的抑制剂(例如,epacadostat)。

[0152] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包括一种或多种选自以下的抑制剂:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化的Hedgehog信号传导通路抑制剂和选择性降解雌激素受体的试剂。

[0153] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包括一种或多种选自以下的治疗剂:曲贝替定(Trabectedin)、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、曲巴尼布(Trebananib)、帕唑帕尼(Pazopanib)、西地尼布(Cediranib)、哌柏西利(Palbociclib)、依维莫司(everolimus)、氟嘧啶(flucytosine)、IFL、瑞戈非尼(regorafenib)、罗利辛(Reolysin)、阿利姆塔(Alimta)、日卡迪亚(Zykadia)、苏坦特(Sutent)、替西罗莫司(temsirolimus)、阿昔替尼(axitinib)、依维莫司(everolimus)、索拉非尼(sorafenib)、沃特力(Votrient)、帕唑帕尼(Pazopanib)、IMA-901、AGS-003、卡博替尼(cabozantinib)、长春氟宁(Vinflunine)、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替马唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFN $\alpha$ 、长春花碱(vinblastine)、沙利度胺(Thalomid)、达卡巴嗪(dacarbazine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、来那度胺(lenalidomide)、氮胞苷(azacytidine)、来那度胺(lenalidomide)、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicin)、卡非佐米(carfilzomib)、普拉曲沙特(pralatrexate)和恩扎他林(enzastaurin)。

[0154] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包括选自以下的一种或多种治疗剂:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$ 、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择素激动剂。

[0155] 在一些实施方案中,另外的治疗剂是抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

#### [0156] 治疗方法及用途

[0157] 本公开提供了抑制或减少受试者中FGF诱导的肿瘤细胞增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物。

[0158] 本公开提供了抑制或减少受试者肿瘤细胞中FGF诱导的FGFR2磷酸化的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物。

[0159] 本公开提供了杀死与FGFR2b异常表达相关的肿瘤细胞并降低受试者的角膜毒性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物、和/或药物组合物。

[0160] 本公开还提供了治疗或预防受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物。

[0161] 进一步地,本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物可用于制备药物和/或试剂盒,所述药物和/或试剂盒例如用于治疗或预防受试者中与FGFR2b异常表达相关的疾病或病症。

[0162] 在一些实施方案中,疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,疾病或病症是特征在于表达或过表达FGFR2b的癌症。在一些实施方案中,疾病或病症是具有FGFR2b突变、FGFR2b扩增、FGFR2b融合、FGFR2易位和/或FGFR2过表达的癌症。

[0163] 在一些实施方案中,癌症包括但不限于卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝细胞癌、肾细胞癌、头颈癌、间皮瘤、黑色素瘤、肉瘤、脑肿瘤、胃食管腺癌、恶性子宫肿瘤、胃食管连接处腺癌、胆管癌、肝内胆管癌和尿路上皮癌。在优选的实施方案中,所述癌症为胃癌。在优选的实施方案中,所述癌症是FGFR2阳性胃癌。在优选的实施方案中,癌症是FGFR2扩增的胃癌。可以利用本领域已知的各种方法来识别患有癌症的患者。

[0164] 治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物或药物组合物可以一次或多次施用。在本文所述的任何方法中,可以至少每周一次(例如,每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每天一次、每天两次或每天三次)向受试者施用本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物,以及任选地,至少一种另外的治疗剂。

[0165] 在一些实施方案中,可以在延长的时间段内(例如,至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或5年的时间段内)向受试者施用本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物。熟练的医疗专业人员可以使用本领域中的任何用于诊断或跟踪治疗效果(例如,观察至少一种癌症症状)的方法来确定治疗期的长度。如本文所述,熟练的医疗专业人员还可以改变向受试者施用的本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物(和/或一种或多种另外的治疗剂)的identity和数量(例如,增加或减少),并且还可以基于对治疗效果的评估(例如,使用本文描述的和本领域中已知的任何方法)调整(例如,增加或减少)向受试者施用本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物(和/或至少一种其他另外的治疗剂)的剂量或频率。

[0166] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物与至少一种另外的治疗剂依次或同时施用。在一些实施方案中,可以在施用本文提供的抗体或其抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、抗体-药物缀合物和/或药物组合物之前或之后向受试者施用至少一种其他另外的治疗剂。

[0167] 从细胞培养试验和动物研究获得的数据可用于配制用于受试者(例如人)的任何给定试剂的适当剂量。本文提供的抗体或其抗原结合片段的治疗有效量是治疗受试者的疾病、降低受试者(例如,人)的疾病的一种或多种症状的严重程度、频率和/或持续时间的量。本文提供的抗体或其抗原结合片段的有效性和剂量可以由医疗保健专业人员或兽医专业人员使用本领域已知的方法来确定,也可以通过观察受试者(例如,人)的一种或多种疾病的症状来确定。某些因素可能会影响有效治疗受试者所需的剂量和时间(例如,疾病或病症的严重程度、之前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄以及其他疾病的存在)。

[0168] 示例性剂量包括每千克受试者体重毫克或微克量的本文提供的抗体或其抗原结合片段或抗体-药物缀合物(例如,约1 $\mu$ g/kg至约500mg/kg;约100 $\mu$ g/kg至约500mg/kg;约100 $\mu$ g/kg至约50mg/kg;约10 $\mu$ g/kg至约5mg/kg;约10 $\mu$ g/kg至约0.5mg/kg;或约1 $\mu$ g/kg至约50 $\mu$ g/kg)。虽然这些剂量覆盖的范围很广,但本领域的普通技术人员将理解,治疗剂(包括抗体及其抗原结合片段)的效力各不相同,并且有效量可以通过本领域已知的方法确定。通常,首先施用相对低的剂量,然后主治医疗保健专业人员或兽医专业人员(在治疗应用的情况下)或研究人员(仍在开发阶段工作时)可以随后逐渐增加剂量,直到获得适当的反应。此外,应了解,对于任何特定受试者的特定剂量水平将取决于多种因素,包括所采用的特定化合物的活性、受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、排泄速率和抗体或抗体片段在体内的半衰期。

[0169] 实施例

[0170] 现在通过下列实施例来说明本发明,但不应将其理解为限制。

[0171] 实施例1抗FGFR2b抗体的制备

[0172] SJL小鼠(5-6周龄雌性)每隔一周通过腹膜内注射FGFR2(beta) IIIb-Fc和抗CD25/CD40抗体(初始抗CD25抗体,然后剂量为100 $\mu$ g/只动物,然后抗CD40抗体,最后2剂量50 $\mu$ g/只动物)进行免疫,抗原悬浮在MPL/TDM(Sigma-Aldrich)中。最后一次注射三天后,提取腭窝淋巴样细胞,并使用Hybrimune电融合系统(Cyto Pulse Sciences)以1:1的比例与Sp2/0-Ag14小鼠骨髓瘤细胞融合。通过添加2x HAT(Sigma)24小时后,来筛选杂交瘤。融合十天后,使用ELISA筛选杂交瘤培养上清液与FGFR2IIIb-his结合、但不与FGFR2IIIc-his结合的能力。然后通过ELISA筛选选定的mAb识别CHOK1-FGFR2IIIb转染子上的FGFR2IIIb、并阻断FGF7与FGFR2IIIb结合的能力。然后采用有限稀释技术对选定的杂交瘤进行两次克隆。对亚克隆的杂交瘤进行测序,并通过与hFc融合产生嵌合抗体。从融合中获得了许多抗FGFR2嵌合抗体,包括mAb HC18。

[0173] 实施例2抗FGFR2b抗体与细胞表面人FGFR2b蛋白结合特异性的FACS分析

[0174] 将适当的细胞( $1 \times 10^5$ )在FACS缓冲液(PBS+2%BSA)中洗涤两次,并在100 $\mu$ l含有连续稀释(1:5)的抗FGFR2b mAb的FACS缓冲液中重新悬浮,并在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后在FACS缓冲液中洗涤细胞两次,并通过在4 $^{\circ}$ C下与APC抗人IgG Fc(Biolegend,产品目录号#410712)孵育1小时来检测结合的抗体。在FACS缓冲液中洗涤两次后,在Cytoflex(Beckmann Coulter)上分析细胞。Aprutumab还作为阳性对照被测试,其可以与FGFR2b和FGFR2c结合。结果如图1所示。与基准(FPA144)相比,本公开的抗体表现出相当的结合能力。

[0175] 实施例3. 抗FGFR2b抗体抑制FGF7和FGF10与FGFR2b的结合

[0176] 通过ELISA测定测量抗FGFR2b抗体对FGF7和FGF10与FGFR2b结合的抑制。每个测定的每个步骤均通过在室温下用适当的试剂孵育1小时来进行,但初始板包被步骤在4 $^{\circ}$ C下过夜进行。在每个步骤之间,在含有0.05%Tween 20的PBS中洗涤板3次。

[0177] 为了确定抗FGFR2b mAb阻断配体与FGFR2b结合的能力,用1 $\mu$ g/ml hFGFR2b-Fc(Kactus,目录号#FGR-HM2BB)包被板,然后用2% BSA阻断。接下来将板与人FGF7-his(20nM,Sino Biological,目录号#10210-H07E)或生物素-FGF10(5nM,Kactus,目录号#FGF-HE010B)在连续稀释(1:5)的抗FGFR2b mAb存在下一起孵育,并用HRP-抗6X His标签(Abcam,目录号#ab1187)或链霉亲和素-蛋白质HRP(Thermo,目录号#21126)和TMB底物

(Cell Signaling, 目录号#7004P6) 检测结合的配体。结果如图2和表4所示。与基准相比, 本公开的抗体显著阻断FGF7与FGFR2b的结合, 但仅部分抑制FGF10与FGFR2b的结合, 这表明本公开的抗体在角膜毒性方面可能具有更好的安全性。

[0178] 表4. 抑制FGF7和FGF10与FGFR2b结合

[0179]	Ab	FGF7			FGF10		
		IC50 (nM)	ODmin	抑制作用 (%)	IC50 (nM)	ODmin	抑制作用 (%)
[0180]	HC18	3.822	0.2941	94.45%	4.989	1.231	54.35%
	FPA144	2.403	0.1725	100.00%	6.652	0.4962	100.00%

[0181] 实施例4. 抗FGFR2b抗体与人FGFR2b抗原结合的表面等离子体反应 (SPR) 传感图

[0182] 使用表面等离子体共振 (Octet, Sartorius) 测量抗FGFR2b mAb对人FGFR2b (FGFR2b-his) 的结合亲和力。使用胺偶联试剂盒将抗FGFR2b mAb固定在葡聚糖芯片上, 并使用含有100 mM乙二胺的100 mM硼酸钠 (pH 8.0) 作为阻断试剂。将FGFR2b-his蛋白在含有0.05%表面活性剂P20的HEPES缓冲盐水运行缓冲液中稀释, 然后流过固定的抗体。结果如图3和表5所示。

[0183] 表5. 抗FGFR2b抗体与人FGFR2b的结合亲和力。

	配体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)
[0184]	HC18	1.87E+05	5.00E-03	2.67E-08

[0185] 实施例5. 抗FGFR2b抗体的ADCC

[0186] 为了生成无岩藻糖基化 (AF) 的mAb, 将客户提供的表达质粒转化到大肠杆菌中, 分别以适当的规模进行增殖。NucleoBond Xtra Maxi Plus EF试剂盒用于大规模质粒生成。用PEI将含有每种抗体重链和轻链的构建体共转染到FUT8-KO CHO细胞中。转染后9-11天收获条件培养基。通过离心和过滤收获表达目标Ab的条件培养基, 然后加载到蛋白A亲和柱上。纯化的Ab通过SDS-PAGE、SEC-HPLC和内毒素测量进行分析。

[0187] 使用FACS分析评估细胞毒活性。效应细胞人外周血单个核细胞来自个体人捐赠者 (Milestone® Biotechnologies), 并用10 ng/ml hIL-2 (PeproTech, 200-02) 培养过夜。表达全长人FGFR2b的靶Ba/F3细胞在37°C下用Celltrace Far red (Thermo, 目录号#C34564) 标记10分钟, 用含10% FBS (Gibco, 目录号#10099-141) 的RPMI 1640培养基 (Gibco, 目录号#A10491-01) 洗涤两次, 然后按效应细胞与靶细胞的比例 (20:1) 铺于96孔圆底板中。将连续稀释 (1:3) 的抗FGFR2b mAb添加到检测板的指定行中。在37°C下孵育4小时后, 向每个孔中添加2μl碘化丙啶染色溶液 (BD biosciences, 目录号#556547), 在室温下对死细胞进行染色10分钟。直接在Cytotflex (Beckmann Coulter) 上进行细胞分析。结果如图4所示, 本公开的抗体 (包括HC18和HC18-AF) 诱导强的ADCC反应以杀死表达FGFR2b的细胞, 并且无岩藻糖基化 (AF) 的抗体显示出更强的效果。

[0188] 实施例6. 抗FGFR2b抗体抑制SNU-16细胞中FGF7和FGF10诱导的FGFR2磷酸化

[0189] 在SNU-16细胞中测量了抗FGFR2b抗体对体外肿瘤细胞FGFR2磷酸化的作用。将约

50,000个SNU-16细胞铺板到96孔板中的RPMI 1640培养基(Gibco,目录号#A10491-01)中,并在37°C、5% CO<sub>2</sub>下孵育4小时。接下来,用连续稀释(1:10)的抗FGFR2b mAb处理SNU-16细胞1小时。然后用30ng/mL FGF7(R&D,目录号#251-KG-01M)或FGF10(Kactus,目录号#FGF-HE010B)和20μg/mL肝素(Sigma,目录号#H3149-500KU)处理SNU-16细胞,并在37°C和5% CO<sub>2</sub>下孵育5分钟。为了收获细胞进行磷酸化FGFR2(Tyr653/654)检测,将96孔板以300g旋转3分钟。然后在不破坏细胞的情况下缓慢抽吸孔中的全部体积。立即加入50μL 1X补充裂解缓冲液(Cisbio,目录号#64FGFR2Y6PEG),并按照制备商的制备方案在室温下摇动孵育至少30分钟。在兼容的**HTRF®**读取器(EnVision,Perkin Elmer)上,通过两种不同波长(665nm和620nm)下的荧光发射读取FGFR2磷酸化。该实验进行了三次。结果如图5所示,本公开的抗体显著抑制FGF7和FGF10诱导的SNU-16细胞中FGFR2磷酸化,尤其抑制了FGF7诱导的FGFR2磷酸化。

[0190] 实施例7.抗FGFR2b抗体抑制SNU-16细胞中FGF7和FGF10诱导的ERK1/2磷酸化

[0191] 在SNU-16细胞中测量了抗FGFR2b抗体对体外肿瘤细胞ERK1/2磷酸化的作用。将约50,000个SNU-16细胞铺板到96孔板中的RPMI 1640培养基(Gibco,目录号#A10491-01)中,并在37°C、5% CO<sub>2</sub>下孵育4小时。接下来,用连续稀释(1:5)的抗FGFR2b mAb处理SNU-16细胞1小时。然后用30ng/mL FGF7(R&D,目录号#251-KG-01M)或FGF10(Kactus,目录号#FGF-HE010B)和20μg/mL肝素(Sigma,目录号#H3149-500KU)处理SNU-16细胞,并在37°C和5% CO<sub>2</sub>下孵育15分钟。为了收获细胞进行磷酸化ERK(Thr202/Tyr204)检测,将96孔板以300g旋转3分钟。然后在不破坏细胞的情况下缓慢抽吸孔中的全部体积。立即加入50μL 1X补充裂解缓冲液(Cisbio,目录号#64ERKPEH),并按照制备商的制备方案在室温下摇动孵育至少30分钟。在兼容的**HTRF®**读取器(EnVision,Perkin Elmer)上,通过两种不同波长(665nm和620nm)下的荧光发射读取ERK1/2磷酸化。该实验进行了三次。结果如图6所示,本公开的抗体显著抑制FGF7和FGF10诱导的SNU-16细胞中ERK1/2磷酸化,尤其抑制了FGF7诱导的ERK1/2磷酸化。

[0192] 实施例8.抗FGFR2b抗体抑制FGF7诱导的SNU-16细胞增殖

[0193] 在SNU-16细胞中测量了抗FGFR2b抗体对体外肿瘤细胞增殖的作用。将约10,000个SNU-16细胞铺板到96孔板中的RPMI 1640培养基(Gibco,目录号#A10491-01)中,以使细胞处于血清饥饿状态,在37°C、5% CO<sub>2</sub>下孵育16小时/过夜。接下来,用连续稀释(1:10)的抗FGFR2b mAb处理SNU-16细胞1小时。然后用50ng/mL FGF7(R&D,目录号#251-KG-01M)和5μg/mL肝素(Sigma,目录号#H3149-500KU)处理SNU-16细胞,并在37°C和5% CO<sub>2</sub>下孵育4天。为了收获细胞进行细胞活力测定,将96孔板以300g旋转3分钟。然后在不破坏细胞的情况下缓慢抽吸孔中总体积的一半(约100μL)。然后按照制备商的制备方案,添加CellTiter-Glo发光细胞活力测定(Promega,目录号#G7571)中的CellTiter-Glo试剂(100μL)。将板在室温下摇动15分钟。在与CellTiter-Glo试剂一起孵育期间,板避免光照。通过SpectraMax M5(Molecular Devices)上的发光读取细胞增殖。该实验进行了三次。结果如图7所示,本公开的抗体对SNU-16增殖的抑制作用与FPA144相同,甚至更好。

[0194] 实施例9.抗FGFR2b mAb的表位分组。

[0195] 通过ELISA测定测量抗FGFR2b抗体的表位分组(epitope binning)。每次测定的每个步骤均通过在室温下用适当的试剂孵育1小时来进行,但初始板包被步骤在4°C下过夜进

行。在每个步骤之间,在含有0.05% Tween 20的PBS中洗涤板3次。

[0196] 为了确定抗FGFR2b mAb的表位分类,用1 $\mu$ g/ml HC18或BMK FPA144包被板,然后用2% BSA封闭。接下来将板与0.1 $\mu$ g/ml生物素-hFGFR2b-Fc (Kactus, 目录号#FGR-HM2BB) 混合物在连续稀释(1:5)的抗FGFR2b mAb存在下一起孵育,并用链霉亲和素-蛋白质HRP (Thermo, 目录号#21126) 和TMB底物(Cell Signaling, 目录号#7004P6) 检测结合的抗原。结果如表6所示,表明本公开的抗体与FPA144相比,具有不同的表位组(epitope bin)。

[0197] 表6.抗FGFR2b mAb的表位分组。

竞争性Ab	FPA144	HC18
FPA144	98%	98%
HC18	57%	94%

[0199] 其他实施方案

[0200] 应当理解,尽管已结合其详细描述描述了本发明,但前述描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改均在以下权利要求的范围内。

[0201] 参考

[0202] 1. Ahn, S., Lee, J., Hong, M., Kim, S.T., Park, S.H., Choi, M.G., Lee, J.H., Sohn, T.S., Bae, J.M., Kim, S., et al. (2016). FGFR2 in gastric cancer: protein overexpression predicts gene amplification and high H-index predicts poor survival. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 29, 1095-1103.

[0203] 2. Angal, S., King, D.J., Bodmer, M.W., Turner, A., Lawson, A.D., Roberts, G., Pedley, B., and Adair, J.R. (1993). A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Molecular immunology* 30, 105-108.

[0204] 3. Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews Drug discovery* 8, 235-253.

[0205] 4. Catenacci, D.V.T., Rasco, D., Lee, J., Rha, S.Y., Lee, K.W., Bang, Y.J., Bendell, J., Enzinger, P., Marina, N., Xiang, H., et al. (2020). Phase I Escalation and Expansion Study of Bemarituzumab (FPA144) in Patients With Advanced Solid Tumors and FGFR2b-Selected Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 38, 2418-2426.

[0206] 5. Grose, R., and Dickson, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 179-186.

[0207] 6. Itoh, N. (2016). FGF10: A multifunctional mesenchymal-epithelial signaling growth factor in development, health, and disease. *Cytokine & growth factor reviews* 28, 63-69.

[0208] 7. Katoh, M., and Katoh, M. (2006). FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). *International journal of oncology* 29, 163-168.

- [0209] 8.Korc,M.,and Friesel,R.E.(2009).The role of fibroblast growth factors in tumor growth.Current cancer drug targets 9,639-651.
- [0210] 9.Nagatsuma,A.K.,Aizawa,M.,Kuwata,T.,Doi,T.,Ohtsu,A.,Fujii,H.,and Ochiai,A.(2015).Expression profiles of HER2,EGFR,MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma.Gastric cancer:official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association 18,227-238.
- [0211] 10.Ornitz,D.M.,Xu,J.,Colvin,J.S.,McEwen,D.G.,MacArthur,C.A.,Coulier,F.,Gao,G.,and Goldfarb,M.(1996).Receptor specificity of the fibroblast growth factor family.J Biol Chem 271,15292-15297.
- [0212] 11.Turner,N.,and Grose,R.(2010).Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.Nature reviews Cancer 10,116-129.
- [0213] 12.Xiang,H.,Chan,A.G.,Ahene,A.,Bellovin,D.I.,Deng,R.,Hsu,A.W.,Jeffrey,U.,Palencia,S.,Powers,J.,Zanghi,J.,et al.(2021).Preclinical characterization of bemarituzumab,an anti-FGFR2b antibody for the treatment of cancer.mAbs 13, 1981202.
- [0214] 13.Zhang,X.,Ibrahimi,O.A.,Olsen,S.K.,Umemori,H.,Mohammadi,M.,and Ornitz,D.M.(2006).Receptor specificity of the fibroblast growth factor family.The complete mammalian FGF family.J Biol Chem 281,15694-15700.
- [0215] 14.Zheng,W.,Ma,M.,Du,E.,Zhang,Z.,Jiang,K.,Gu,Q.,and Ke,B.(2015).Therapeutic efficacy of fibroblast growth factor 10 in a rabbit model of dry eye.Molecular medicine reports 12,7344-7350.

### CHOK1-FGFR2b 结合

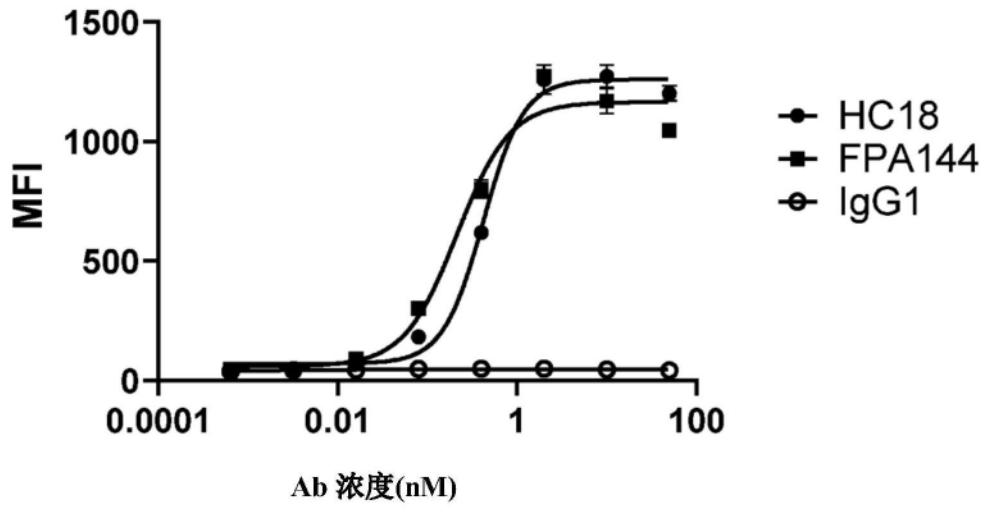


图1A

### CHOK1-FGFR2c 结合

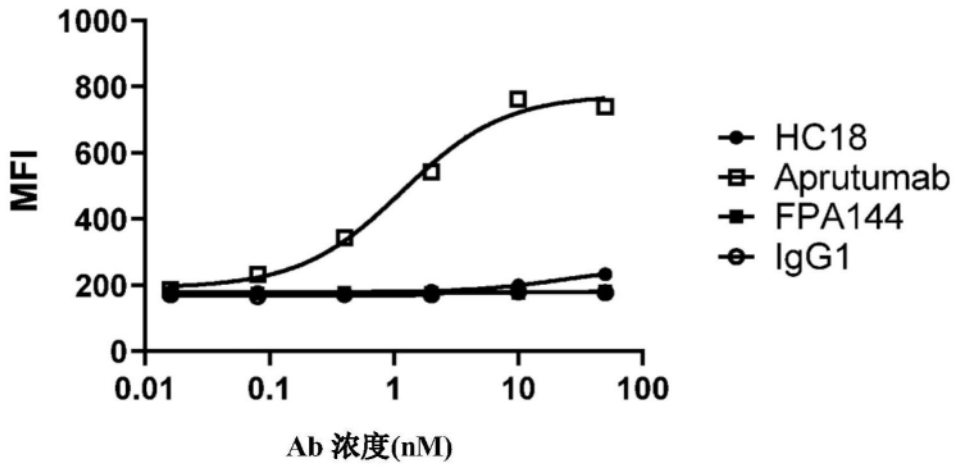


图1B

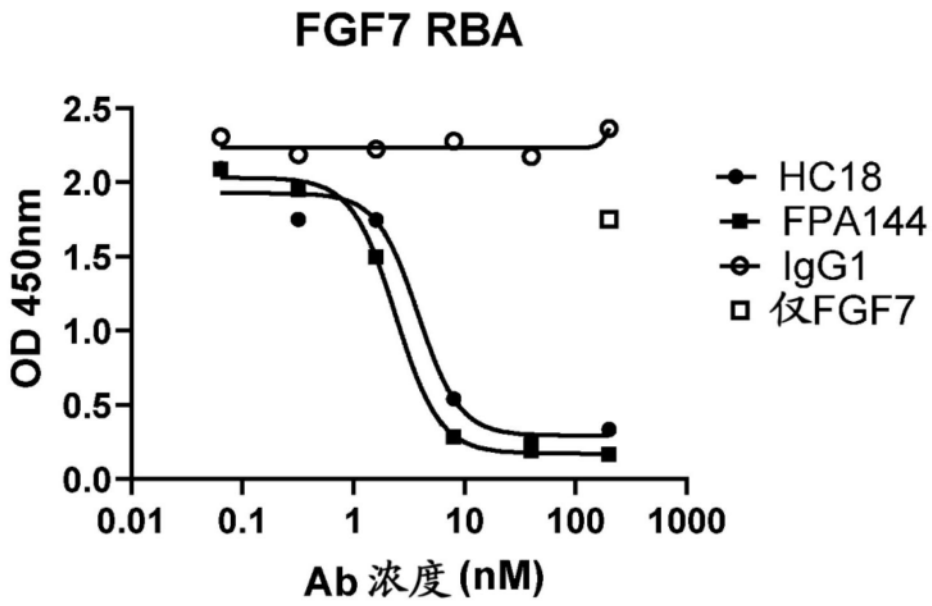


图2A

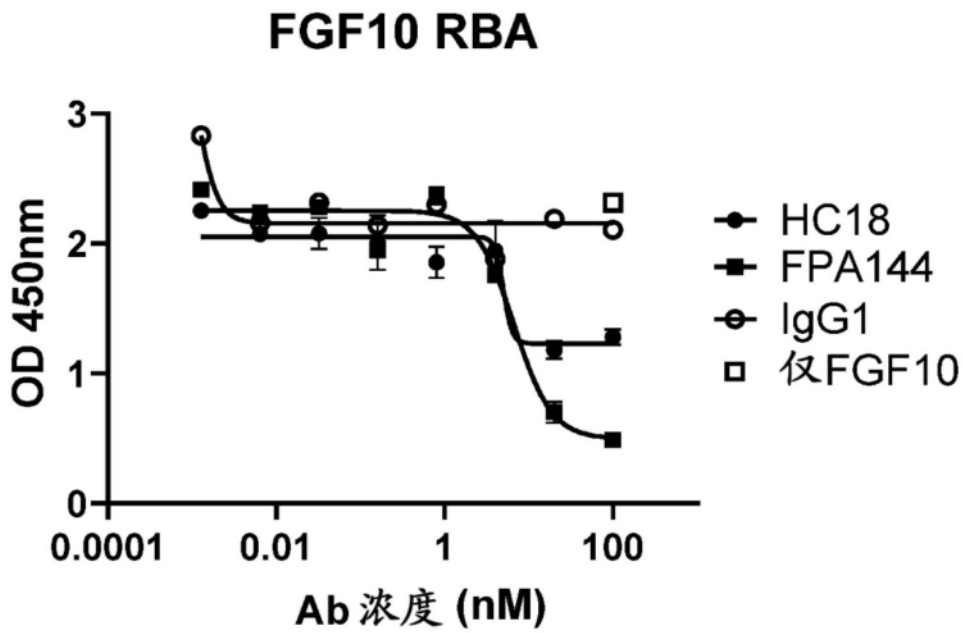


图2B

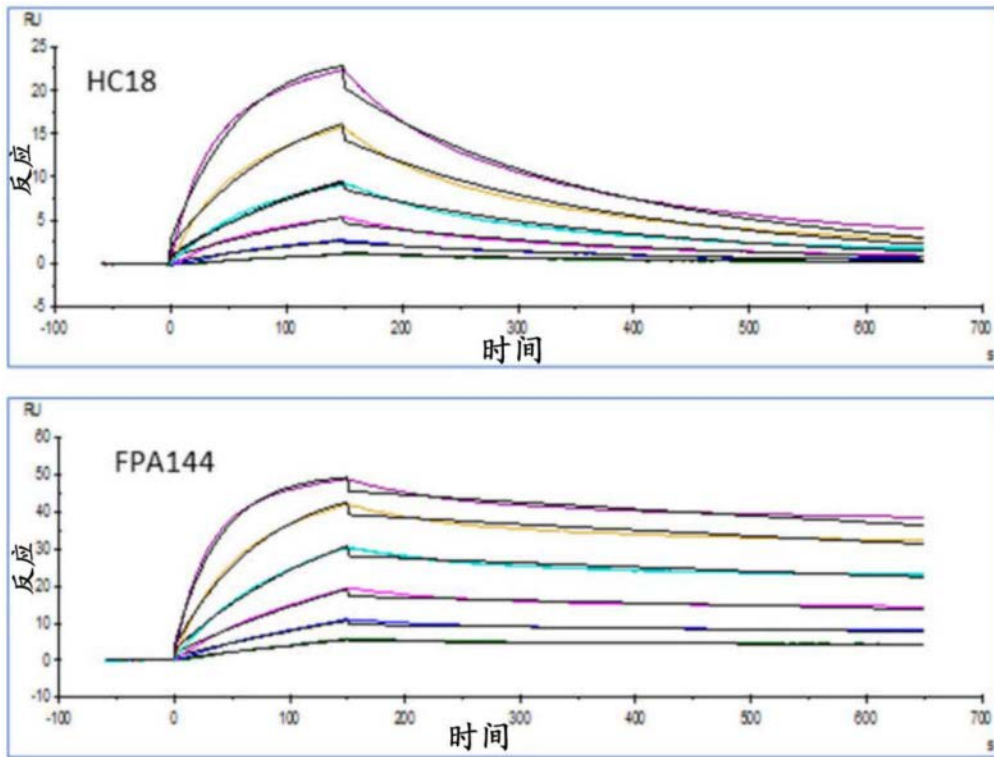


图3

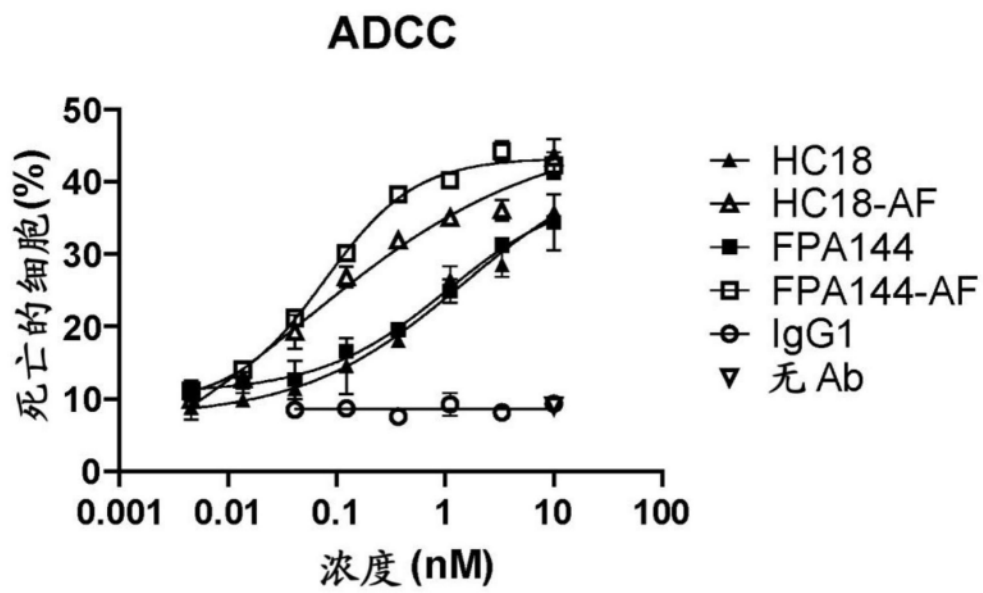


图4

### FGF7 刺激的 SNU-16 的 p-FGFR2

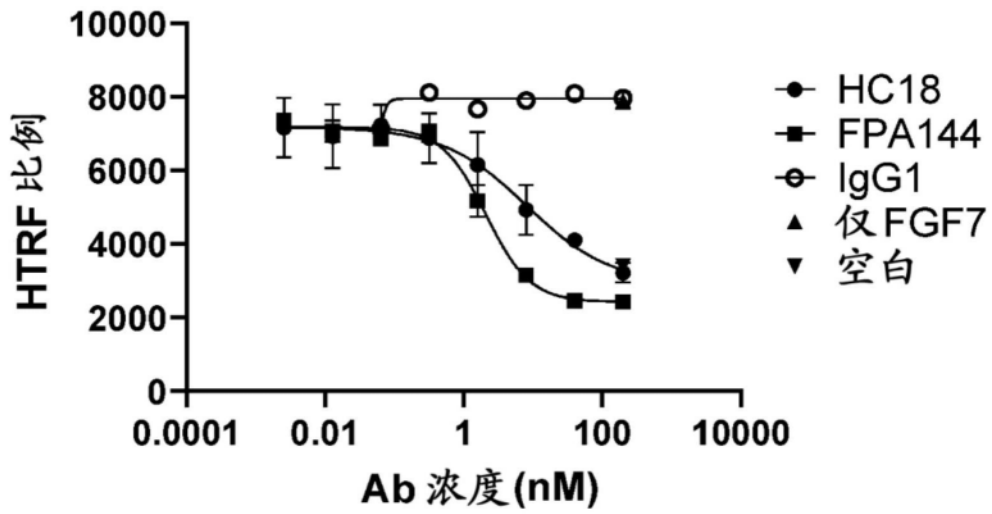


图5A

### FGF10 刺激的 SNU-16 的 p-FGFR2

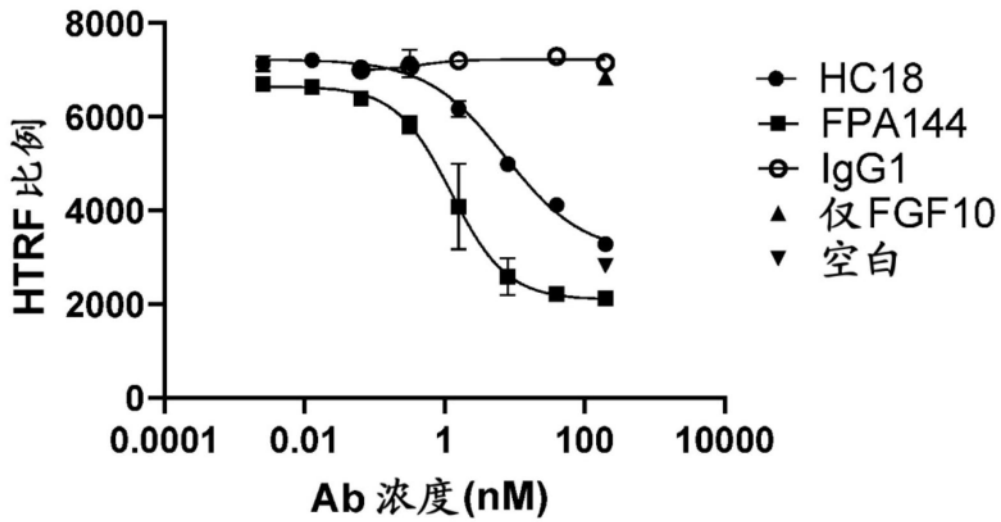


图5B

### FGF7刺激的SNU-16的p-ERK1/2

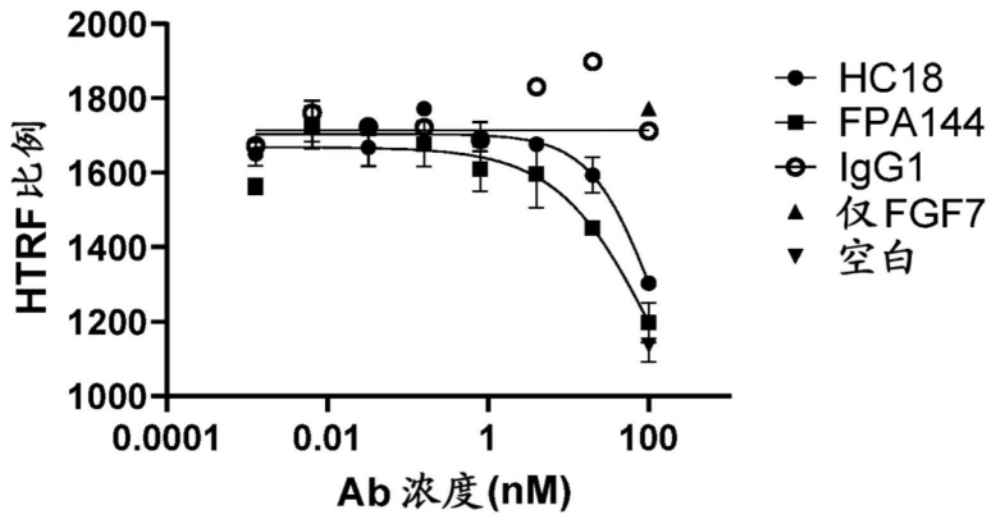


图6A

### FGF10刺激的SNU-16的p-ERK1/2

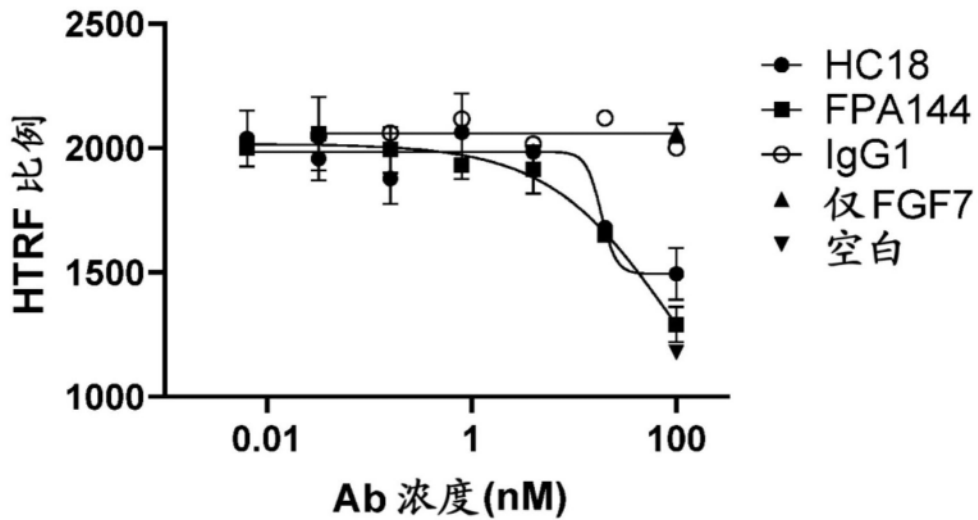


图6B

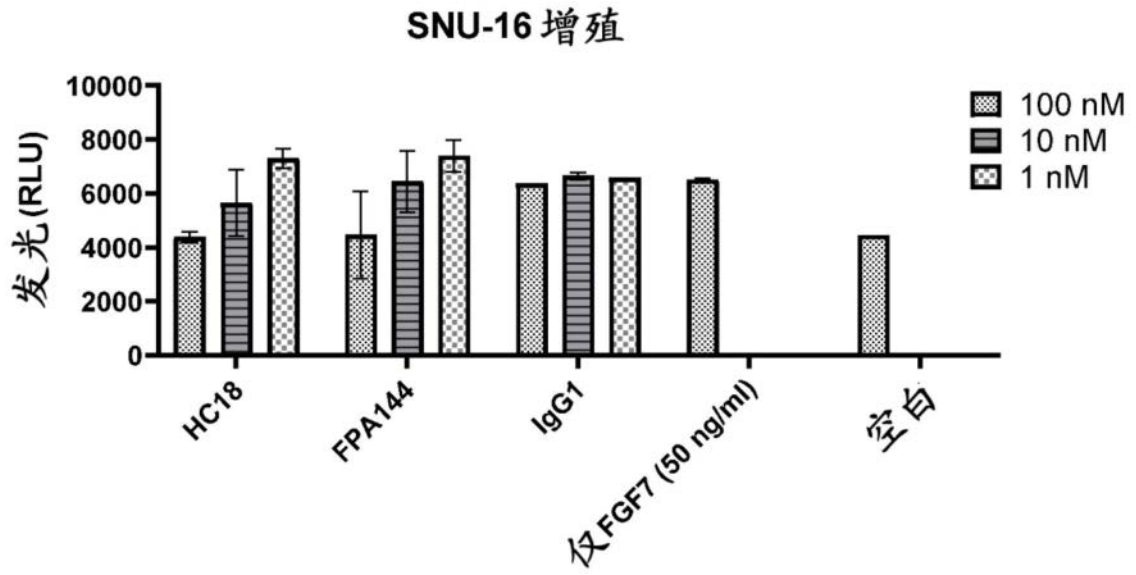


图7