



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I633120 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：103126289

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 31 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/08/01 美國

61/861,198

2013/11/08 美國

61/901,732

2014/01/30 美國

61/933,632

(71)申請人：戊瑞治療有限公司(美國) FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：哈汀 湯瑪士 HARDING, THOMAS (GB)；皮爾斯 克莉斯藤 PIERCE, KRISTEN

(US)；派提爾 南姆瑞塔 PATIL, NAMRATA (US)；布雷曼 湯瑪士 BRENNAN,

THOMAS (US)；漢普雷頓 茱莉 HAMBLETON, JULIE (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 102131524A

Yamane-Ohnuki, Naoko, and Mitsuo Satoh. "Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation." MAbs. Vol. 1. No. 3. Taylor & Francis, 2009.

Niwa, Rinpei, et al. "IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn 297-linked oligosaccharides." Journal of immunological methods 306.1 (2005): 151-160.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：29 項 圖式數：11 共 101 頁

(54)名稱

無海藻糖基化抗 FGFR2IIIB 抗體

AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES

(57)摘要

本發明提供結合 FGFR2IIIB 之抗體，其中該等抗體為無海藻糖基化抗體。本發明提供包含結合 FGFR2IIIB 之抗體的組合物，其中該組合物中之該等抗體之至少 95% 為無海藻糖基化抗體。在一些實施例中，提供治療癌症之方法，其包含投與無海藻糖基化抗 FGFR2IIIB 抗體。

The present invention provides antibodies that bind FGFR2IIIB, wherein the antibodies are afucosylated. The present invention provides compositions comprising antibodies that bind FGFR2IIIB, wherein at least 95% of the antibodies in the composition are afucosylated. In some embodiments, methods of treating cancer comprising administering afucosylated anti-FGFR2IIIB antibodies are provided.

指定代表圖：

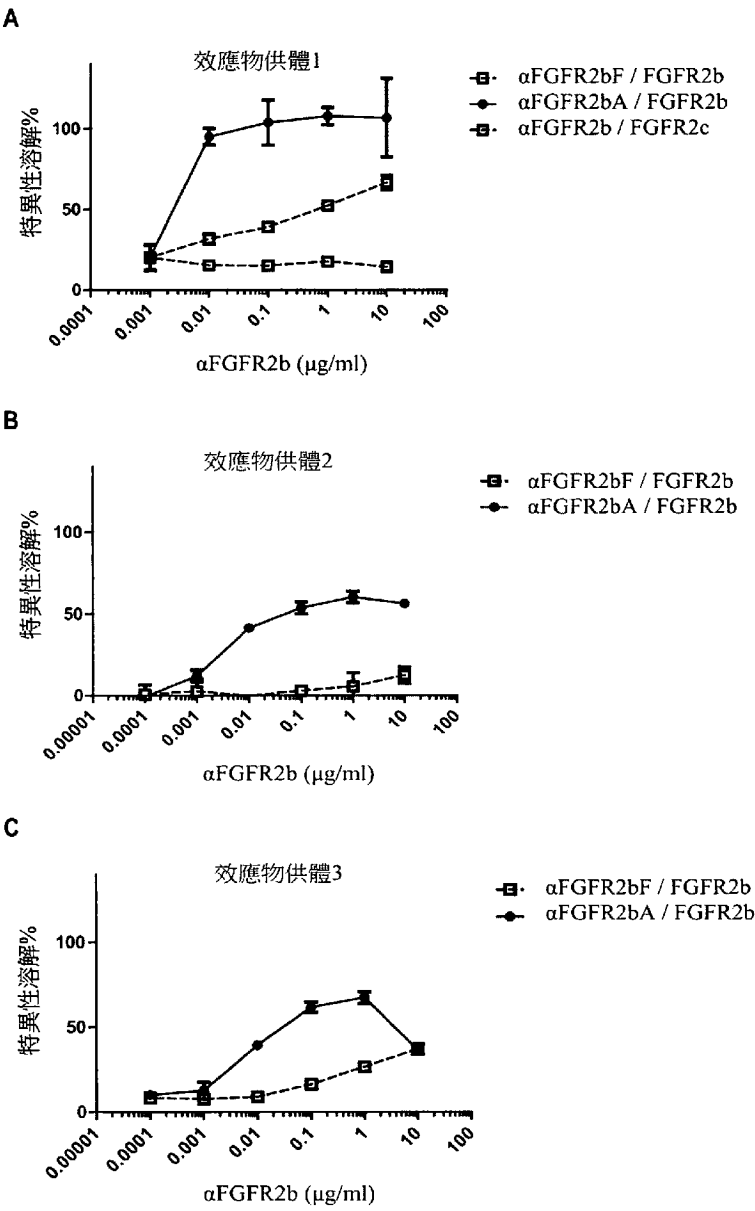


圖 1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

無海藻糖基化抗FGFR2IIIB抗體

AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES

【技術領域】

提供無海藻糖基化抗FGFR2IIb抗體。

【先前技術】

纖維母細胞生長因子(FGF)家族成員結合4種已知酪胺酸激酶受體纖維母細胞生長因子受體1-4(FGFR1-4)及其同功異型物，其中各種FGF在不同程度上結合不同FGFR(Zhang等人，J. Biol. Chem. 281:15694, 2006)。人類FGFR2之蛋白質序列係提供於例如GenBank基因座AF487553中。各FGFR由包含3個免疫球蛋白(Ig)樣域(D1、D2及D3)之細胞外域(ECD)、單一跨膜螺旋及細胞內催化激酶域組成(Mohammadi等人，Cytokine Growth Factor Revs, 16:107, 2005)。在D1與D2之間的連接子中存在一段連續酸性胺基酸，稱為「酸框」(AB)。咸信含有D1及AB之區域涉及於受體之自抑制中，該自抑制藉由結合於配體而解除。FGF主要經由受體之D2及D3中之區域結合受體。FGFR之特徵在於其mRNA存在多種替代性拼接，從而產生多種同功異型物(Ornitz等人，J. Biol. Chem. 271:15292, 1996；對於FGFR2及其同功異型物之序列，亦參見Swiss-Prot P21802及同功異型物P21802-1至P21802-20)。值得注意的是，存在含有所有3個Ig域(α 同功異型物)或僅含有2個Ig域D2及D3域而無D1 (β 同功異型物)的形式。在FGFR1-FGFR3中，所有形式皆含有D3之第一半部(表示為IIIa)，但2個替代性外顯子可用於D3之第二半部，從而產生IIIb及IIIc形式。對

於FGFR2，此等分別表示為FGFR2IIIb及FGFR2IIIc(或僅FGFR2b及FGFR2c)；相應 β 形式表示為FGFR2(β)IIIb及FGFR2(β)IIIc。FGFR2之FGFR2IIIb形式(亦表示為K-sam-II)為一種對於FGF1與KGF家族成員(FGF7、FGF10及FGF22)兩者均具有親和力之受體，而FGFR2IIIc(亦表示為K-sam-I)充分結合FGF1與FGF2兩者，但不結合KGF家族成員(Miki等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:246, 1992)。實際上，FGFR2IIIb為KGF家族成員之唯一受體(Ornitz等人, 1996, *op. cit.*)且因此亦指定為KGFR。

FGFR及其同功異型物差異性表現於各種組織中。FGFR2IIIb(及FGFR1及FGFR3之IIIb形式)表現於上皮組織中，而FGFRIIIc表現於間質組織中(Duan等人, J. Biol. Chem. 267:16076, 1992；Ornitz等人, 1996, *op. cit.*)。此等受體之某些FGF配體具有相反表現樣式。因此，包括FGF7(KGF)、FGF10及FGF22之KGF次家族成員僅結合FGFRIIIb(Zhang等人, *op. cit.*)且表現於間質組織中，因此可為上皮細胞之旁分泌效應物(Ornitz等人, 1996, *op. cit.*)。相反，FGF4次家族成員FGF4-6結合FGFR2IIIc且表現於上皮譜系與間質譜系兩者中，因此可具有自分泌或旁分泌功能。由於FGFR2之同功異型物及其配體具有各種表現樣式，FGFR2在上皮-間質相互作用中起作用(Finch等人, Dev. Dyn. 203:223, 1995)，因此不令人驚訝的是剔除小鼠中之FGFR2IIIb會產生嚴重胚胎缺陷及致死性(De Moerlooze等人, Development 127:483, 2000)。

KGF(FGF7)及KGFR(FGFR2IIIb)在許多胰腺癌中過度表現(Ishiwata等人, Am. J. Pathol. 153: 213, 1998)，且其共表現與不良預後相關聯(Cho等人, Am. J. Pathol. 170:1964, 2007)。在一大組子宮內膜(子宮)癌中，發現有12%涉及FGFR2基因之體細胞突變，且在若干測試病例中，該等體細胞突變為腫瘤細胞存活所需(Dutt等人, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 105:8713, 2008)。在2種腫瘤中，發現FGFR2突變為與亞伯特症候群(Apert syndrome)相關之相同S252W取代。FGFR2之擴增及過度表現與具有特別不良預後之未分化彌漫型胃癌相關，且藉由小分子化合物抑制FGFR2活性強力抑制此等癌細胞之增殖(Kunii等人, Cancer Res. 68:2340, 2008；Nakamura等人, Gastroenterol. 131:1530, 2006)。

【發明內容】

在一些實施例中，提供一種抗FGFR2IIIb抗體，其中重鏈可變區包含：(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；且輕鏈可變區包含：(iv)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(v)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(vi)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3；其中該抗體為無海藻糖基化抗體。在一些實施例中，抗體在Asn297處缺乏海藻糖。在一些實施例中，提供包含複數種抗FGFR2IIIb抗體之組合物，其中該組合物中之各抗FGFR2IIIb抗體之重鏈可變區包含：(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；且該組合物中之各抗FGFR2IIIb抗體之輕鏈可變區包含：(iv)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(v)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(vi)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3；其中該組合物中之該等抗體之至少95%為無海藻糖基化抗體。在一些實施例中，組合物可為抗體產生細胞株之上清液。在一些實施例中，組合物可為緩衝化組合物。在一些實施例中，重鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4。在一些實施例中，輕鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5。在一些實施例中，重鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4且輕鏈可變域包含胺基

酸序列SEQ ID NO: 5。在一些實施例中，重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2。在一些實施例中，輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3。在一些實施例中，重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2且輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3。在一些實施例中，提供一種包含複數種無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之組合物，其中該等抗體與包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之重鏈可變域及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之輕鏈可變域的抗體競爭結合FGFR2IIIb。

在一些實施例中，抗體為單株抗體。在一些實施例中，抗體為嵌合抗體。在一些實施例中，抗體為人類化抗體。在本文所述之任何實施例中，抗體可包含 κ 輕鏈恆定區。在本文所述之任何實施例中，抗體可包含IgG1重鏈恆定區。

在一些實施例中，抗體相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之活體外ADCC活性。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體導致特異性溶解比用海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體達成之特異性溶解大至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少60、至少65、至少70或至少75個百分點。在一些實施例中，使用表現FGFR2IIIb之Ba/F3細胞作為目標細胞以及經分離人類PBMC作為效應細胞測定ADCC活性。

在一些實施例中，抗體相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體結合Fc γ RIIIA之親和力比海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體大至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少7倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍、至少17倍或至少20倍。在一些實施例中，使用表面電漿子共振測定對Fc γ RIIIA之親和力。在一些實施例中，Fc γ RIIIA係選自Fc γ RIIIA(V158)及Fc γ

RIIIA(F158)。在一些實施例中，Fc γ RIIIA為Fc γ RIIIA(V158)。

在本文所述之任何實施例中，抗體可結合FGFR2IIIb而非FGFR2IIIc。

在本文所述之任何實施例中，包含複數種無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之組合物包含至少95%無海藻糖基化抗體。在本文所述之任何實施例中，包含複數種無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之組合物可具有不可偵測之海藻糖基化。在一些實施例中，可藉由包含高效液相層析(HPLC)、毛細管電泳或MALDI-TOF質譜分析之方法確定海藻糖之存在性。

在一些實施例中，提供包含編碼本文所述之抗FGFR2IIIb抗體之核酸的寄主細胞，其中該寄主細胞缺乏功能性 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因(FUT8)。在一些實施例中，寄主細胞為CHO細胞。

在一些實施例中，提供用於製備無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之方法。在一些實施例中，方法包含在適於表現編碼抗FGFR2IIIb抗體之核酸之條件下培養寄主細胞，其中該寄主細胞缺乏功能性 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因(FUT8)。在一些實施例中，用於製備無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之方法包含在適於產生無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之條件下培養寄主細胞。在一些實施例中，方法進一步包含回收由寄主細胞產生之抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，小於5%的由寄主細胞產生之抗FGFR2IIIb抗體包含海藻糖。在一些實施例中，至少95%的由寄主細胞產生之抗FGFR2IIIb抗體缺乏海藻糖(亦即無海藻糖基化)。在一些實施例中，在由寄主細胞產生之抗FGFR2IIIb抗體中，海藻糖不可偵測。在一些實施例中，藉由包含HPLC、毛細管電泳或MALDI-TOF質譜分析之方法偵測海藻糖之存在性。

在一些實施例中，提供藥物組合物，其中該醫藥組合物包含本文所述之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體及醫藥學上可接受之載劑。 5

在一些實施例中，提供治療癌症之方法。在一些實施例中，方法包含投與有效量之包含本文所述之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在一些實施例中，癌症係選自胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌及食道癌。在一些實施例中，癌症為胃癌。在一些實施例中，癌症包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，FGFR2擴增包含FGFR2:CEN10(染色體10著絲粒)比率>3。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表現量。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，藉由IHC確定FGFR2IIIb之表現或過度表現。在一些實施例中，根據IHC，1+、2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，根據IHC，2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，如實例6中所述對IHC染色計分。

在一些實施例中，治療癌症之方法進一步包含投與至少一種選自鉑藥劑、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、ABRAXANE®、多西他賽(docetaxel)、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱(capecitabine)、伊立替康(irinotecan)、表柔比星(epirubicin)、FOLFOX、FOLFIRI、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、氟尿嘧啶(flourouracil)、絲裂黴素C(mitomycin C)及小紅莓(doxorubicin)鹽酸鹽之其他治療劑。在一些實施例中，鉑藥劑係選自順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)。在一些實施例中，治療癌症之方法進一步包含投與太平洋紫杉醇。在一些實施例中，治療癌症之方法進一步包含投與順鉑及/或5-FU。

在一些實施例中，提供包含本文所述之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物的用途。在一些實施例中，此用途係用於治療患有癌症之個體之癌症。在一些實施例中，癌症係選自胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌或食道癌。在一些實施例中，癌症為胃癌。在一些實施例中，癌症包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，FGFR2擴增包含FGFR2:CEN10(染色體10著絲粒)比率>3。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表現量。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，藉由IHC確定FGFR2IIIb之表現或過度表現。在一些實施例中，根據IHC，1+、2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，根據IHC，2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，如實例6中所述對IHC染色計分。

在一些實施例中，提供用於治療癌症之藥物組合物，其中該醫藥組合物包含本文所述之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，癌症係選自胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌或食道癌。在一些實施例中，癌症為胃癌。在一些實施例中，癌症包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，FGFR2擴增包含FGFR2:CEN10(染色體10著絲粒)比率>3。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表⁵

現量。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，藉由IHC確定FGFR2IIIb之表現或過度表現。在一些實施例中，根據IHC，1+、2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，根據IHC，2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，如實例6中所述對IHC染色計分。

【圖式簡單說明】

圖1A至1C顯示無海藻糖基化 α FGFR2bA及海藻糖基化 α FGFR2bF針對FGFR2IIIb表現Ba/F3細胞之ADCC活性，如實例3中所論述。在圖例中，「 α FGFR2bF/FGFR2b」指示相對於FGFR2IIIb表現Ba/F3目標細胞測試海藻糖基化 α FGFR2bF抗體。

圖2A至2D顯示無海藻糖基化 α FGFR2bA及海藻糖基化 α FGFR2bF在(A及B)10 mg/kg及(C及D)3 mg/kg下在OCUM-2M胃癌異種移植模型中之功效，如實例4中所論述。

圖3A及3B顯示無海藻糖基化 α FGFR2bA在OCUM-2M胃癌異種移植模型中之劑量依賴性功效，如實例4中所論述。

圖4A及4B顯示無海藻糖基化 α FGFR2bA與太平洋紫杉醇之組合療法在OCUM-2M胃癌異種移植模型中之功效，如實例4中所論述。

圖5A及5B顯示無海藻糖基化 α FGFR2bA與5-FU/順鉑之組合療法在OCUM-2M胃癌異種移植模型中之功效，如實例4中所論述。

圖6A及6B顯示無海藻糖基化 α FGFR2bA在MFM-223乳癌異種移植模型中之功效，如實例4中所論述。

圖7顯示在(A) Potelligent® CHOK1SV細胞及(B)CHOK1SV細胞中產生之 α FGFR2b抗體之聚糖概況，如實例1中所述。

圖8顯示通常見於抗體中之N-連接聚糖之示意圖。

圖9顯示遞增濃度之 α FGFR2bA或 α FGFR2bF對 Ba/F3 FGF2b細胞

之ADCC。分析係用正常人類PBMC在E:T比率25:1下進行，如實例5中所述。資料繪製為LDH釋放量。

圖10顯示遞增濃度之 α FGFR2bA或 α FGFR2bF對 OCUM-2M細胞之ADCC。分析係用正常人類PBMC在E:T比率25:1下進行。如實例5中所述。資料繪製為特異性溶解百分比。

圖11A至11F顯示使用免疫組織化學分析偵測腫瘤組織樣品中之FGFR2IIIb，如實例6中所述。

【實施方式】

提供結合FGFR2IIIb之無海藻糖基化抗體。在一些實施例中，亦提供能夠形成結合FGFR2IIIb之抗體之無海藻糖基化抗體重鏈及輕鏈。在一些實施例中，提供包含一或多個特定高變區(HVR)之無海藻糖基化抗體、重鏈及輕鏈。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體相對於海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之ADCC活性。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體相對於海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體相對於海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體相對於海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA(F158)具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體不結合FGFR2IIIc。

提供編碼結合FGFR2IIIb之抗體之聚核苷酸。亦提供編碼抗體重鏈或輕鏈之聚核苷酸。提供表現無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之寄主細胞。提供使用針對FGFR2IIIb之無海藻糖基化抗體之治療方法。此等方法包括但不限於治療癌症，諸如胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌及食道癌之方法。

本文所用之章節標題僅出於組織目的且不應解釋為限制所述標

的物。

本文中引用之所有參考資料(包括專利申請案、專利公開案及 Genbank 登錄號)以引用的方式併入本文中，該引用的程度就如同將各個別參照資料明確且個別地指示以全文引用的方式併入本文中一般。

本文中描述或參考之技術及程序通常為熟習此項技術者所充分瞭解且通常使用習知方法加以採用，該方法諸如以下中所述之廣泛利用之方法：Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第 3 版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.；*CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, 等人編，(2003))；叢書 *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及 G. R. Taylor 編 (1995))；Harlow 及 Lane 編 (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*；及 *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney 編 (1987))；*Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 編，1984)；*Methods in Molecular Biology*, Humana Press；*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis 編，1998) Academic Press；*Animal Cell Culture* (R. I. Freshney) 編，1987)；*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather 及 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press；*Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths 及 D. G. Newell 編，1993-8) J. Wiley and Sons；*Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 及 C. C. Blackwell 編)；*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller 及 M. P. Calos 編，1987)；*PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等人編，1994)；*Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等人編，1991)；*Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999)；*Immunobiology* (C. A. Janeway 及 P. Travers, 1997)；*Antibodies* (P. Finch, 1997)；*Antibodies: A Practical*

Approach (D. Catty編, IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd及C. Dean編, Oxford University Press, 2000) ; Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow及D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti及J. D. Capra編, Harwood Academic Publishers, 1995) ; 及 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita等人編, J.B. Lippincott Company, 1993) ; 及其更新版本。

I. 定義

除非另外定義，否則與本發明關聯使用之科學及技術術語將具有由一般技藝人士通常所理解之含義。此外，除非另外為上下文所需或明確指示，否則單數術語將包括複數且複數術語將包括單數。

應瞭解本文所述之本發明之態樣及實施例包括「由態樣及實施例組成」及/或「基本上由態樣及實施例組成」。除非另外指示，否則如本文所用，單數形式「一」及「該」包括複數個提及物。

在本申請案中，除非明確陳述或為熟習此項技術者所瞭解，否則使用「或」意謂「及/或」。在多重附屬性申請專利範圍之情形下，使用「或」回指一個以上先前獨立性或附屬性申請專利範圍。

如熟習此項技術者所瞭解，在本文中提及「約」某一數值或參數包括(且描述)有關彼數值或參數本身之實施例。舉例而言，提及「約X」之描述包括對「X」之描述。

術語「核酸分子」、「核酸」及「聚核苷酸」可互換使用，且係指核苷酸聚合物。此等核苷酸聚合物可含有天然及/或非天然核苷酸，且包括但不限於DNA、RNA及PNA。「核酸序列」係指構成核酸分子或聚核苷酸之線性核苷酸序列。

術語「多肽」與「蛋白質」可互換用於指代胺基酸殘基聚合物，且不限於最小長度。此等胺基酸殘基聚合物可含有天然或非天然胺基

酸殘基，且包括但不限於由胺基酸殘基組成之肽、寡肽、二聚體、三聚體及多聚體。全長蛋白質與其片段兩者均由該定義涵蓋。術語亦包括多肽之表現後修飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化及其類似修飾。此外，出於本發明之目的，「多肽」係指包括對天然序列之修飾，諸如缺失、添加及取代(在自然界中通常為保守性的)之蛋白質，只要該蛋白質保持所要活性即可。此等修飾可為故意的，如經由定點突變誘發，或可為偶然的，諸如經由產生蛋白質之寄主之突變或歸因於PCR擴增之錯誤。

「FGFR2IIIb」或「FGFR2b」可互換用於指代纖維母細胞生長因子受體2 IIIb拼接形式。一示範性人類FGFR2IIIb係用2013年7月7日標注日期之GenBank登錄號NP_075259.4加以顯示。一非限制性示範性成熟人類FGFR2IIIb胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 1中。

「FGFR2IIIc」或「FGFR2c」可互換用於指代纖維母細胞生長因子受體2 IIIc拼接形式。一示範性人類FGFR2IIIc係用2013年7月7日標注日期之GenBank登錄號NP_000132.3加以顯示。一非限制性示範性成熟FGFR2IIIc胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 12中。

術語「抗原決定基」係指目標分子(例如抗原，諸如蛋白質、核酸、碳水化合物或脂質)上由抗原結合分子(例如抗體、抗體片段或含有抗體結合區域之骨架蛋白質)結合之位點。抗原決定基常由一組化學活性表面分子，諸如胺基酸、多肽或糖側鏈組成且具有特定三維結構特徵以及特定電荷特徵。抗原決定基可由目標分子之連續殘基或相鄰非連續殘基(例如胺基酸、核苷酸、糖、脂質部分)兩者形成。由連續殘基(例如胺基酸、核苷酸、糖、脂質部分)形成之抗原決定基在暴露於變性溶劑時通常得以保留，而藉由三級折疊形成之抗原決定基在用變性溶劑處理時通常喪失。抗原決定基可包括但不限於至少3、至少5或8-10個殘基(例如胺基酸或核苷酸)。在一些實例中，抗原決定基

之長度為小於20個殘基(例如胺基酸或核苷酸)、小於15個殘基或小於12個殘基。若2種抗體對抗原展現競爭性結合，則其可結合該抗原內之相同抗原決定基。

「非線性抗原決定基」或「構形抗原決定基」包含對該抗原決定基具有特異性之抗體所結合之抗原性蛋白質內的非連續多肽、胺基酸及/或糖。

「線性抗原決定基」包含對該抗原決定基具有特異性之抗體所結合之抗原性蛋白質內的連續多肽、胺基酸及/或糖。

術語「抗體」在本文中係以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所要抗原結合活性即可。

術語抗體包括但不限於能夠結合抗原之片段，諸如Fv、單鏈Fv(scFv)、Fab、Fab'及(Fab')₂。木瓜蛋白酶消化抗體會產生2個相同抗原結合片段，稱為「Fab」片段，各自具有單一抗原結合位點；以及殘餘「Fc」片段，其名稱反映其能夠易於結晶。胃蛋白酶處理會產生具有2個抗原結合位點且仍然能夠交聯抗原之F(ab')₂片段。術語抗體亦包括但不限於嵌合抗體、人類化抗體及諸如小鼠、人類、食蟹獼猴等之各種物種之抗體。

術語「重鏈可變區」係指包含重鏈HVR1、構架(FR)2、HVR2、FR3及HVR3之區域。在一些實施例中，重鏈可變區亦包含至少一部分FR1及/或至少一部分FR4。

術語「重鏈恆定區」係指包含至少3個重鏈恆定域C_H1、C_H2及C_H3之區域。非限制性示範性重鏈恆定區包括γ、δ及α。非限制性示範性重鏈恆定區亦包括ε及μ。各重恆定區對應於抗體同型。舉例而言，包含γ恆定區之抗體為IgG抗體，包含δ恆定區之抗體為IgD抗體，且包含α恆定區之抗體為IgA抗體。此外，包含μ恆定區之抗體為IgM抗體，且包

含 ϵ 恆定區之抗體為IgE抗體。某些同型可進一步再分成子類。舉例而言，IgG抗體包括但不限於IgG1(包含 γ_1 恆定區)、IgG2(包含 γ_2 恆定區)、IgG3(包含 γ_3 恆定區)及IgG4(包含 γ_4 恆定區)抗體；IgA抗體包括但不限於IgA1(包含 α_1 恆定區)及IgA2(包含 α_2 恆定區)抗體；且IgM抗體包括但不限於IgM1及IgM2。

術語「重鏈」係指包含至少重鏈可變區之有或無前導序列的多肽。在一些實施例中，重鏈包含至少一部分重鏈恆定區。術語「全長重鏈」係指包含重鏈可變區及重鏈恆定區之有或無前導序列的多肽。

術語「輕鏈可變區」係指包含輕鏈HVR1、構架(FR)2、HVR2、FR3及HVR3之區域。在一些實施例中，輕鏈可變區亦包含FR1及/或FR4。

術語「輕鏈恆定區」係指包含輕鏈恆定域 C_L 之區域。非限制性示範性輕鏈恆定區包括 λ 及 κ 。

術語「輕鏈」係指包含至少輕鏈可變區之有或無前導序列的多肽。在一些實施例中，輕鏈包含至少一部分輕鏈恆定區。術語「全長輕鏈」係指包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區之有或無前導序列的多肽。

術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域之在序列方面高度可變及/或形成結構確定環(「高變環」)之各區域。一般而言，天然四鏈抗體包含6個HVR；3個在 V_H 中(H1、H2、H3)，且3個在 V_L 中(L1、L2、L3)。HVR通常包含來自高變環之胺基酸殘基及/或來自「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，後者具有最高序列可變性及/或參與抗原識別。示範性高變環存在於胺基酸殘基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)處。(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。)示範性CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)存在於L1之胺基酸殘基24-34、L2之胺基酸殘基50-56、L3之胺基酸殘基89-97、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之

胺基酸殘基50-65及H3之胺基酸殘基95-102處。(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。術語高變區(HVR)與互補決定區(CDR)在本文中可關於可變區之形成抗原結合區之部分互換使用。

出於本文之目的，「接受體人類構架」為以下構架：其包含源於如以下定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(V_L)構架或重鏈可變域(V_H)構架的胺基酸序列。源於人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含其相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化數目為10或10以下、9或9以下、8或8以下、7或7以下、6或6以下、5或5以下、4或4以下、3或3以下、或2或2以下。在一些實施例中， V_L 接受體人類構架在序列方面與 V_L 人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列相同。

「親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和之強度。在一些實施例中，「結合親和力」係指反映結合對之成員(例如抗體及抗原)之間的1:1相互作用之內在結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力可通常由解離常數(K_d)表示。親和力可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所述者)加以量測。

「親和力成熟」抗體係指相較於在一或多個高變區(HVR)及/或互補決定區(CDR)中不具有一或多個改變之親本抗體，具有此等改變之抗體，此等改變導致抗體對抗原之親和力得以改良。

「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分源於特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分源於不同來源或物種之抗體。在一些實施例中，嵌合抗體係指包含至少一個來自第一物種(諸如小鼠、大鼠、食蟹獼猴等)之可變區及至少一個來自第二物種(諸如人類、食蟹獼猴等)

之恆定區的抗體。在一些實施例中，嵌合抗體包含至少一個小鼠可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體包含至少一個食蟹獼猴可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體之全部可變區皆來自第一物種且嵌合抗體之全部恆定區皆來自第二物種。

「人類化抗體」係指非人類可變區之構架區中之至少一個胺基酸已經來自人類可變區之相應胺基酸置換的抗體。在一些實施例中，人類化抗體包含至少一個人類恆定區或其片段。在一些實施例中，人類化抗體為Fab、scFv、(Fab')₂等。

「HVR移植抗體」係指第一(非人類)物種之一或多個高變區(HVR)已移植於第二(人類)物種之構架區(FR)上之人類化抗體。

「功能性Fc區」具有天然序列Fc區之「效應物功能」。示範性「效應物功能」包括Fc受體結合；C1q結合；CDC；ADCC；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之下調等。此等效應物功能通常需要Fc區與結合域(例如抗體可變域)組合且可使用各種分析加以評估。

「天然序列Fc區」包含與在自然界中所見之Fc區之胺基酸序列相同的胺基酸序列。天然序列人類Fc區包括天然序列人類IgG1 Fc區(非A及A異型)；天然序列人類IgG2 Fc區；天然序列人類IgG3 Fc區；及天然序列人類IgG4 Fc區以及其天然存在之變異體。

「變異Fc區」包含由於至少一個胺基酸修飾而不同於天然序列Fc區之胺基酸序列的胺基酸序列。

「Fc受體」或「FcR」描述結合抗體之Fc區之受體。在一些實施例中，FcγR為天然人類FcR。在一些實施例中，FcR為結合IgG抗體者(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII子類之受體，包括彼等受體之對偶基因變異體及替代拼接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA(「活化

性受體」)及FcγRIIB(「抑制性受體」)，其具有主要在其細胞質域方面不同之類似胺基酸序列。活化性受體FcγRIIA在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基活化基元(ITAM)。抑制性受體FcγRIIB在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基抑制基元(ITIM)。(參見例如Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR例如評述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)；Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)中。其他FcR(包括欲在未來鑒定之彼等FcR)在本文中由術語「FcR」涵蓋。

術語「Fc受體」或「FcR」亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))且調控免疫球蛋白之體內平衡。量測與FcRn之結合之方法為已知的(參見例如Ghetie及Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997)；Ghetie等人, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997)；Hinton等人, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)；WO 2004/92219 (Hinton等人))。

「效應物功能」係指可歸因於抗體之Fc區之生物活性，其隨抗體同型而變化。抗體效應物功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細胞活化。

「人類效應細胞」為表現一或多種FcR且執行效應物功能之白血球。在某些實施例中，細胞表現至少FcγRIII且執行ADCC效應物功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、巨噬細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球。效應細胞可自天然來源，例如自血液分離。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種形式

之細胞毒性，其中分泌之Ig結合於存在於某些細胞毒性細胞(例如NK細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)上使得此等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合攜帶抗原之目標細胞且隨後用細胞毒素殺傷該目標細胞。用於介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現Fc γ RIII，而單核細胞表現Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII。FcR在造血細胞上之表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)之第464頁上之表3中。為評估相關分子之ADCC活性，可進行活體外ADCC分析，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或美國專利第6,737,056 (Presta)號中所述之分析。適用於此等分析之效應細胞包括PBMC及NK細胞。或者或另外，相關分子之ADCC活性可例如在動物模型，諸如Clynes等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998)中揭露之動物模型中進行活體內評估。Fc區胺基酸序列改變及ADCC活性增加或降低之其他抗體例如描述於美國專利第7,923,538號及美國專利第7,994,290號中。

具有「增強之ADCC活性」之抗體係指相較於親本抗體，在活體外或在活體內更有效介導ADCC之抗體，其中抗體與親本抗體在至少一個結構方面不同，且此時用於分析中之此抗體及親本抗體之量基本上相同。在一些實施例中，抗體與親本抗體具有相同胺基酸序列，但抗體為無海藻糖基化抗體，而親本抗體為海藻糖基化抗體。在一些實施例中，將使用如本文揭露之活體外ADCC分析測定ADCC活性，但涵蓋用於測定例如動物模型等中之ADCC活性之其他分析或方法。在一些實施例中，ADCC活性增強之抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，ADCC活性增強之抗體對Fc γ RIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，ADCC活性增強之抗體對Fc γ RIIIA(F158)具有增強之親和力。

FcR結合親和力或ADCC活性「改變」之抗體為相較於親本抗體，

具有增強或減弱之FcR結合活性及/或ADCC活性的抗體，其中該抗體與該親本抗體在至少一個結構方面不同。對FcR「顯示結合增加」之抗體結合至少一種FcR之親和力優於親本抗體。對FcR「顯示結合降低」之抗體結合至少一種FcR之親和力低於親本抗體。對FcR顯示結合降低之此等抗體可具有少許或不具有與FcR之明顯結合，例如相較於天然序列IgG Fc區，與FcR之0-20%結合。

「對Fc γ RIIIA之親和力增強」係指抗體對Fc γ RIIIA (在一些情況下亦稱為CD16a)之親和力大於親本抗體，其中該抗體與該親本抗體在至少一個結構方面不同。在一些實施例中，抗體與親本抗體具有相同胺基酸序列，但抗體為無海藻糖基化抗體，而親本抗體為海藻糖基化抗體。可使用適用於測定對Fc γ RIIIA之親和力之任何方法。在一些實施例中，藉由本文所述之方法測定對Fc γ RIIIA之親和力。在一些實施例中，對Fc γ RIIIA之親和力增強之抗體具有增強之ADCC活性。在一些實施例中，對Fc γ RIIIA之親和力增強之抗體對Fc γ RIIIA (V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，對Fc γ RIIIA之親和力增強之抗體對Fc γ RIIIA (F158)具有增強之親和力。

「無海藻糖基化」抗體或「缺乏海藻糖」之抗體係指在其恆定區糖基化方面缺乏海藻糖之IgG1或IgG3同型抗體。人類IgG1或IgG3之糖基化以用多達2個Gal殘基終止之核心海藻糖基化雙觸角複合寡醣糖基化形式存在於Asn297處。在一些實施例中，無海藻糖基化抗體在Asn297處缺乏海藻糖。視末端Gal殘基之量而定，此等結構被指定為G0、G1 (α 1,6或 α 1,3)或G2聚糖殘基。參見例如Raju, T. S., *BioProcess Int.* 1: 44-53 (2003)。抗體Fc之CHO類型糖基化例如描述於Routier, F. H., *Glycoconjugate J.* 14: 201-207 (1997)中。在一些實施例中，在非糖修飾之CHO寄主細胞中重組表現之一批抗體中有至少85%在Asn297處經海藻糖基化。當提及包含複數種抗體之組合物時，若組合物中<5%

之抗體在Asn297處包含海藻糖，則抗體被視為無海藻糖基化。量測海藻糖之方法包括此項技術中已知之任何方法，包括本文所述之方法。在一些實施例中，藉由實例1中所述之方法偵測海藻糖。在一些實施例中，在包含複數種無海藻糖基化抗體之組合物中，海藻糖不可偵測。在一些實施例中，無海藻糖基化抗體具有增強之ADCC活性。在一些實施例中，無海藻糖基化抗體對Fc γ RIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗體對Fc γ RIIA (V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗體對Fc γ RIIA (F158)具有增強之親和力。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下使目標細胞溶解。經典補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組分(C1q)結合於抗體(屬於適當子類)來引發，該等抗體結合於其同源抗原。為評估補體活化，可進行例如如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述之CDC分析。Fc區胺基酸序列改變及C1q結合能力增加或降低之抗體例如描述於美國專利第6,194,551 B1號、美國專利第7,923,538號、美國專利第7,994,290號及WO 1999/51642中。亦參見例如Idusogie等人, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

如本文所用之術語「實質上類似」或「實質上相同」表示在兩個或兩個以上數值之間存在足夠高度類似性以致熟習此項技術者將視該兩個或兩個以上值之間的差異在藉由該值量度之生物特徵之情形下具有少許或不具有生物及/或統計顯著性。在一些實施例中，兩個或兩個以上實質上類似值之差異至多為約5%、10%、15%、20%、25%或50%之任一者。

如本文所用之片語「實質上降低」或「實質上不同」表示在兩個數值之間存在足夠高度差異以致熟習此項技術者將視該兩個值之間的差異在藉由該值量度之生物特徵之情形下具有統計顯著性。在一些實

施例中，兩個實質上不同數值之差異大於約10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%之任一者。

術語「前導序列」與「信號序列」可互換用於指代位於多肽之N末端之有助於多肽自哺乳動物細胞分泌之胺基酸殘基序列。前導序列可在多肽自哺乳動物細胞排出後裂解，從而形成成熟蛋白質。前導序列可為天然或合成的，且其可與其所連接之蛋白質異源或同源。

「天然序列」多肽包含與在自然界中所見之多肽具有相同胺基酸序列之多肽。因此，天然序列多肽可具有來自任何哺乳動物之天然存在之多肽的胺基酸序列。此天然序列多肽可自自然界分離或可藉由重組或合成手段產生。術語「天然序列」多肽明確涵蓋天然存在之截短或分泌形式之多肽(例如細胞外域序列)、天然存在之變異形式(例如替代拼接形式)及多肽之天然存在之對偶基因變異體。

多肽「變異體」意謂在對準序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比，且不將任何保守性取代視為序列一致性之一部分之後，與天然序列多肽具有至少約80%胺基酸序列一致性之生物活性多肽。此等變異體包括例如在多肽之N末端或C末端處添加或缺失一或多個胺基酸殘基之多肽。在一些實施例中，變異體將具有至少約80%胺基酸序列一致性。在某一實施例中，變異體將具有至少約90%胺基酸序列一致性。在某一實施例中，變異體將與天然序列多肽具有至少約95%胺基酸序列一致性。

如本文所用，關於肽、多肽或抗體序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」及「同源性」定義為在對準序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比，且不將任何保守性取代視為序列一致性之一部分之後，候選序列中與特定肽或多肽序列中之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基之百分比。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可

以屬於此項技術中之技能之各種方式達成，該等方式例如使用可公開獲得之電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™(DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定適用於量測比對之參數，包括為歷經所比較序列之全長達成最大對準所需之任何算法。

胺基酸取代可包括但不限於用另一胺基酸置換多肽中之一個胺基酸。保守性取代顯示於表1中之標題「較佳取代」下。更實質性變化提供於表1中之標題「示範性取代」下，且如以下關於胺基酸側鏈類別進一步所述。胺基酸取代可引入相關抗體中且篩檢具有所要活性(例如維持/改良之抗原結合性、降低之免疫原性或改良之ADCC或CDC)之產物。

表1

原始殘基	示範性取代	較佳取代
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 ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; 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 ; 正白胺酸	Leu

可根據共同側鏈性質對胺基酸分組：

(1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 鹼性：His、Lys、Arg；

(5) 影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；

(6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要將此等類別之一之成員更換成另一類別。

術語「載體」用於描述可經工程改造以含有一或多種可在寄主細胞中增殖之經選殖聚核苷酸之聚核苷酸。載體可包括以下元件之一或多者：複製起點、一或多種調控相關多肽表現之調控序列(諸如啟動子及/或增強子)、及/或一或多種可選擇標記基因(諸如抗生素抗性基因及可用於比色分析中之基因，例如 β -半乳糖苷酶)。術語「表現載體」係指用於在寄主細胞中表現相關多肽之載體。

「寄主細胞」係指可為或已為載體或經分離聚核苷酸之接受者之細胞。寄主細胞可為原核細胞或真核細胞。示範性真核細胞包括哺乳動物細胞，諸如靈長類動物或非靈長類動物細胞；真菌細胞，諸如酵母；植物細胞；及昆蟲細胞。非限制性示範性哺乳動物細胞包括但不限於NSO細胞、PER.C6[®]細胞(Crucell)、及293及CHO細胞及其衍生物，分別諸如293-6E及DG44細胞。

術語「經分離」係指分子已與至少一些其通常在自然界中與之一一起發現或產生之組分分離。舉例而言，當多肽與其經產生所處之細胞之至少一些組分分離時，其稱為「經分離」。當在表現之後多肽由細胞分泌時，使含有該多肽之上清液與產生其之細胞物理分離被視為「分離」該多肽。類似地，聚核苷酸在其不為其通常在自然界中被發現所處之較大聚核苷酸(在DNA聚核苷酸之情況下諸如基因組DNA或粒線體DNA)之一部分，或例如在RNA聚核苷酸之情況下，與其經產生所處之細胞之至少一些組分分離時稱為「經分離」。因此，在寄主細胞內部

之載體中含有之DNA聚核苷酸可稱為「經分離」。

術語「個體」或「受試者」在本文中可互換用於指代動物；例如哺乳動物。在一些實施例中，提供治療哺乳動物之方法，該等哺乳動物包括但不限於人類、齧齒動物、猿、貓科動物、犬科動物、馬科動物、牛科動物、豬科動物、羊科動物、山羊科動物、哺乳動物實驗室動物、哺乳動物家畜、哺乳動物體育動物及哺乳動物寵物。在一些實施例中，「個體」或「受試者」係指需要治療疾病或病症之個體或受試者。

「疾病」或「病症」係指需要治療之狀況。

術語「癌症」係指與細胞增殖不受控制、細胞生長無限制、及經由細胞凋亡之細胞死亡降低相關的惡性增殖病症。非限制性示範性癌症包括胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌及食道癌。在一些實施例中，癌症包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，FGFR2擴增包含FGFR2:CEN10(染色體10著絲粒)比率 >3 。在一些實施例中，包含FGFR2基因擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表現量。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，胃癌包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，包含FGFR2基因擴增之胃癌過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之胃癌過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之胃癌表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表現量。在一些實施例中，胃癌過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴

增。在一些實施例中，過度表現為mRNA過度表現。在一些實施例中，過度表現為蛋白質過度表現。

術語「腫瘤」在本文中用於指代展現異常高程度增殖及生長之一組細胞。腫瘤可為良性、惡性前或惡性的；惡性腫瘤細胞為癌性細胞。腫瘤細胞可為實體腫瘤細胞或白血病腫瘤細胞。術語「腫瘤生長」在本文中用於指代由構成腫瘤之導致腫瘤尺寸相應增加之一或多個細胞達成的增殖或生長。

如本文所用，「治療」為用於獲得有益或所要臨床結果之方法。如本文所用之「治療」涵蓋針對包括人類之哺乳動物之疾病的治療劑之任何投與或施用。出於本發明之目的，有益或所要臨床結果包括但不限於以下任何一或多者：減輕一或多種症狀、減小疾病程度、預防或延遲疾病蔓延(例如轉移，例如向肺或向淋巴結轉移)、預防或延遲疾病復發、延遲或減緩疾病進展、改善疾病病況、抑制疾病或疾病進展、抑制或減緩疾病或其進展、遏止其發展、及緩解(無論部分或總體)。「治療」亦涵蓋減輕增殖疾病之病理後果。本發明方法涵蓋此等治療態樣之任何一或多者。

在癌症之情形下，術語「治療」包括以下任一者或全部：抑制腫瘤細胞或癌細胞生長、抑制腫瘤細胞或癌細胞複製、減輕腫瘤總體負荷及改善與疾病相關之一或多種症狀。

術語「抑制」係指降低或終止任何表型特徵或降低或終止彼特徵之發生、程度或可能性。「降低」或「抑制」在於相較於參照，減小、降低或遏止活性、功能及/或量。在某些實施例中，就「降低」或「抑制」而言，其意謂能夠導致總體降低20%或20%以上。在另一實施例中，就「降低」或「抑制」而言，其意謂能夠導致總體降低50%或50%以上。在另一實施例中，就「降低」或「抑制」而言，其意謂能夠導致總體降低75%、85%、90%、95%或95%以上。

如本文所用之「參照」係指出於比較目的使用之任何樣品、標準物或含量。參照可自健康及/或非患病樣品獲得。在一些實例中，參照可自未治療樣品獲得。在一些實例中，參照係自標的個體之非患病或非治療樣品獲得。在一些實例中，參照係自一或多個不為受試者或患者之健康個體獲得。

如本文所用，「延遲疾病發展」意謂延緩、阻礙、減緩、減慢、穩定化、抑制及/或推遲疾病(諸如癌症)發展。視病史及/或所治療之個體而定，此延遲可具有不同時長。如為熟習此項技術者所顯而易知，充分或顯著延遲可實際上涵蓋預防，因為個體未顯現疾病。舉例而言，可延遲晚期癌症，諸如轉移發展。

如本文所用之「預防」包括提供關於在可易患疾病，但尚未診斷有該疾病之受試者中出現或復發該疾病的防治。

如本文所用，「抑制」功能或活性在於相較於除相關條件或參數之外的另外相同條件或者相較於另一條件，降低該功能或活性。舉例而言，相較於在不存在抑制腫瘤生長之抗體下之腫瘤生長速率，該抗體使腫瘤生長速率降低。

藥劑之「有效量」係指在必需劑量下且持續必需時期，有效達成所要治療或防治結果之量。

本發明之物質/分子、促效劑或拮抗劑之「治療有效量」可根據諸如個體之疾病病況、年齡、性別及重量以及該物質/分子、促效劑或拮抗劑在個體中引發所要反應之能力的因素而變化。治療有效量亦為治療有益作用超過物質/分子、促效劑或拮抗劑之任何毒性或有害作用之量。治療有效量可以一或多次投藥加以傳遞。

「防治有效量」係指在必需劑量下且持續必需時期，有效達成所要防治結果之量。通常但非必定，因為防治劑量係在疾病之前或早期用於受試者中，所以防治有效量將小於治療有效量。

術語「醫藥調配物」及「醫藥組合物」係指以下製劑：其呈允許活性成分之生物活性有效之形式，且不含對將投與調配物之受試者具有不可接受毒性之額外組分。此等調配物可為無菌的。

「醫藥學上可接受之載劑」係指供與治療劑一起使用，共同構成用於向受試者投與之「醫藥組合物」之此項技術中習知的無毒固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、囊封物質、調配助劑或載劑。醫藥學上可接受之載劑應在所用劑量及濃度下對接受者無毒且可與調配物之其他成分相容。醫藥學上可接受之載劑應適於所用調配物。

「無菌」調配物為無菌的或基本上不含活微生物及其孢子。

「與一或多種其他治療劑組合」投藥包括同時(併行)投藥及以任何順序連續或依序投藥。

術語「併行」在本文中用於指代投與兩種或兩種以上治療劑，其中至少一部分投藥在時間上重疊或其中一種治療劑之投藥相對於另一治療劑之投藥係在短時期內進行。舉例而言，兩種或兩種以上治療劑係以時間間隔至多約60分鐘，諸如至多約30、15、10、5或1分鐘之任一者加以投與。

術語「依序」在本文中用於指代投與兩種或兩種以上治療劑，其中在中止投與一或多種其他藥劑之後繼續投與一或多種藥劑。舉例而言，兩種或兩種以上治療劑之投藥係以時間間隔超過約15分鐘，諸如約20、30、40、50或60分鐘、1天、2天、3天、1週、2週或1個月或1個月以上之任一者加以投與。

如本文所用，「連同...一起」係指除另一治療模態之外亦投與一種治療模態。因此，「連同...一起」係指在向個體投與另一治療模態之前、期間或之後投與一種治療模態。

術語「包裝插頁」用於代表慣常包括在治療產品之商業包裝中之說明書，其含有關於適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌症⁵

及/或涉及此等治療產品之使用之警告的資訊。

「製品」為包含至少一種試劑，例如用於治療疾病或病症(例如癌症)之藥劑或用於特異性偵測本文所述之生物標記物之探針的任何製造品(例如包裝或容器)或套組。在某些實施例中，製造品或套組係以用於執行本文所述之方法之組合件形式推銷、銷售或販賣。

II. 抗FGFR2IIIb抗體

在一些態樣中，本發明提供一種針對FGFR2IIIb之無海藻糖基化抗體。無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包括但不限於人類化抗體、嵌合抗體、小鼠抗體、人類抗體及包含本文論述之重鏈及/或輕鏈HVR(例如CDR)之抗體。在一個態樣中，本發明提供結合FGFR2IIIb之經分離無海藻糖基化抗體。在某些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體調節FGFR2IIIb活性。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之ADCC活性。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA(F158)具有增強之親和力。

本文所述之在實例及序列表中指定為「 α FGFR2b」之抗FGFR2IIIb抗體意欲與2012年1月24日頒予之美國專利第8,101,723 B2號中之抗體HuGAL-FR21具有相同胺基酸序列。美國專利第8,101,723 B2號出於任何目的以引用的方式明確併入本文中，且特定言之，美國專利第8,101,723 B2號之顯示HuGAL-FR21之可變區及全長成熟抗體鏈胺基酸序列的圖13及14出於任何目的以引用的方式併入本文中。此外，抗體HuGAL-FR21之在美國專利第8,101,723 B2號之圖13中加下劃線的HVR序列出於任何目的以引用的方式明確併入本文中。

在一個態樣中，本發明提供一種包含至少一個、兩個、三個、四

個、五個或六個選自以下之HVR(例如CDR)之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3。

在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含至少一個包含重鏈可變區及至少一部分重鏈恆定區之重鏈、及至少一個包含輕鏈可變區及至少一部分輕鏈恆定區之輕鏈。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含兩個重鏈，其中各重鏈包含重鏈可變區及至少一部分重鏈恆定區；及兩個輕鏈，其中各輕鏈包含輕鏈可變區及至少一部分輕鏈恆定區。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含含有序列SEQ ID NO:4之重鏈可變區及含有序列SEQ ID NO:5之輕鏈可變區。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 2之重鏈及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之輕鏈。

在一個態樣中，本發明提供一種包含六個HVR之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，該等HVR包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-H2；(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:8之HVR-H3；(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO:10之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO:11之HVR-L3。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含六個如上所述之HVR且結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含六個如上所述之HVR，結合FGFR2IIIb且具有至少一種選自以下之活性：增強之ADCC活性⁵

及增強之對Fc γ RIIIA(諸如Fc γ RIIIA(V158)及/或Fc γ RIIIA(F158))之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體不結合FGFR2IIIc。

在一個態樣中，本發明提供一種與包含六個HVR之抗FGFR2IIIb抗體競爭的無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，該等HVR包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-H2；(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:8之HVR-H3；(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO:10之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO:11之HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之V_H HVR序列之無海藻糖基化抗體：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:8之HVR-H3。

在另一態樣中，本發明提供一種包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之V_L HVR序列之無海藻糖基化抗體：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:10之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:11之HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之無海藻糖基化抗體包含(a)包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之V_H HVR序列之V_H域：(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之HVR-H1，(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-H2，及(iii)包含選自SEQ ID NO:8之胺基酸序列之HVR-H3；及(b)包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之V_L HVR序列之V_L域：(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L1，(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO:10之HVR-L2，及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:11之HVR-L3。

在另一態樣中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈可變域(V_H)序列。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之V_H序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 4中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR以外之區域中(亦即在FR中)。視情況，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含V_H序列SEQ ID NO: 5，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，V_H包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1，(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2，及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3。

在另一態樣中，提供一種無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，其中該抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 5具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈可變域(V_L)。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之V_L序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 5中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR以外之區域中(亦即在FR中)。視情況，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含V_L序列SEQ ID NO: 4，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，V_L包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之

HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3。

在另一態樣中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈可變域(V_H)序列及與胺基酸序列SEQ ID NO: 5具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈可變域(V_L)。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之V_H序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，且相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之V_L序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 4中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 5中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR以外之區域中(亦即在FR中)。視情況，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含V_H序列SEQ ID NO: 4及V_L序列SEQ ID NO: 5，包括一或兩個序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，V_H包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；且V_L包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3。

在另一態樣中，提供一種無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，其中該抗體包含如任何以上提供之實施例中之V_H及如任何以上提供之實施例中之V_L。在一個實施例中，抗體包含分別於SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5中之V_H序列及V_L序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

在另一態樣中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈序列。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之重鏈序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 2中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR以外之區域中(亦即在FR中)。視情況，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體重鏈包含V_H序列SEQ ID NO: 2，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，重鏈包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1，(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2，及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3。

在另一態樣中，提供一種無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，其中該抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之輕鏈序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇

性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 3中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR以外之區域中(亦即在FR中)。視情況，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體輕鏈包含V_L序列SEQ ID NO: 3，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，輕鏈包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3。

在另一態樣中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈序列及與胺基酸序列SEQ ID NO: 3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈序列。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之重鏈序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之輕鏈序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗FGFR2IIIb抗體保留結合FGFR2IIIb之能力。在某些實施例中，此抗FGFR2IIIb抗體保留選擇性結合FGFR2IIIb而不結合FGFR2IIIc之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 2中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 3中，總計1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR以外之區域中(亦即在FR中)。視情況，

無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體重鏈包含V_H序列SEQ ID NO: 2，包括彼序列之轉譯後修飾，且無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體包含V_L序列SEQ ID NO: 3，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，重鏈包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；且輕鏈包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3。

示範性嵌合抗體

在某些實施例中，本文提供之諸如無海藻糖基化抗體之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體例如描述於美國專利第4,816,567號；及Morrison等人, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :6851-6855 (1984))中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如源於小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物(諸如猴)之可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體為「類別轉換」抗體，其中類別或子類已自親本抗體之類別或子類發生改變。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

非限制性示範性無海藻糖基化嵌合抗體包括包含本文所述之重鏈HVR1、HVR2及HVR3及/或輕鏈HVR1、HVR2及HVR3序列的嵌合抗體。在一些實施例中，無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體包含上述可變區且結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體包含上述可變區，結合FGFR2IIIb且具有至少一種選自以下之活性：增強之ADCC活性及增強之對Fc γ RIIIA(諸如Fc γ RIIIA(V158)及/或Fc γ RIIIA(F158))之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體不結合FGFR2IIIc。

在一些實施例中，無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體包含含有⁵

與SEQ ID NO: 4至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的重鏈，其中該抗體結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體包含含有與SEQ ID NO: 5至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的輕鏈，其中該抗體結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體包含含有與SEQ ID NO: 4至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的重鏈；及含有與SEQ ID NO: 5至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的輕鏈；其中該抗體結合FGFR2IIIb。

示範性無海藻糖基化嵌合抗FGFR2IIIb抗體亦包括與本文所述之抗體或其片段競爭結合FGFR2IIIb之嵌合抗體。因此，在一些實施例中，提供與包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之重鏈可變區及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之輕鏈可變區的抗體競爭結合FGFR2IIIb之嵌合抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，抗體競爭結合FGFR2IIIb，但不結合FGFR2IIIc。

在一些實施例中，本文所述之嵌合抗體包含一或多個人類恆定區。在一些實施例中，人類重鏈恆定區具有選自IgA、IgG及IgD之同型。在一些實施例中，人類輕鏈恆定區具有選自 κ 及 λ 之同型。在一些實施例中，本文所述之嵌合抗體包含人類IgG恆定區。在一些實施例中，本文所述之嵌合抗體包含人類IgG4重鏈恆定區。在一些實施例中，本文所述之嵌合抗體包含人類IgG4恆定區及人類 κ 輕鏈。

如上所指示，效應物功能是否合乎需要可取決於抗體所意欲之特定治療方法。因此，在一些實施例中，當效應物功能合乎需要時，選

擇包含人類IgG1重鏈恆定區或人類IgG3重鏈恆定區之嵌合抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，當效應物功能不合乎需要時，選擇包含人類IgG4或IgG2重鏈恆定區之嵌合抗FGFR2IIIb抗體。

示範性人類化抗體

在一些實施例中，提供結合FGFR2IIIb之無海藻糖基化人類化抗體。人類化抗體適用作治療分子，因為人類化抗體降低或消除對非人類抗體之人類免疫反應(諸如人類抗小鼠抗體(HAMA)反應)，該免疫反應可導致對抗體治療劑之免疫反應及治療劑有效性降低。

在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常，非人類抗體經人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中例如CDR之HVR(或其部分)源於非人類抗體，且FR(或其部分)源於人類抗體序列。人類化抗體視情況亦將包含至少一部分人類恆定區。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如HVR殘基所來源之抗體)之相應殘基取代，例如以恢復或改良抗體特異性或親和力。

人類化抗體及其製備方法例如評述於Almagro及Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633中，且例如進一步描述於以下中：Riechmann等人, (1988) *Nature* 332:323-329；Queen等人, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Kashmiri等人, (2005) *Methods* 36:25-34(描述SDR (a-CDR)移植)；Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498(描述「重塑」)；Dall'Acqua等人, (2005) *Methods* 36:43-60(描述「FR改組」)；以及Osborn等人, (2005) *Methods* 36:61-68及Klimka等人, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260(描述用以FR改組之「指導選擇」方法)。

可用於人類化之人類構架區包括但不限於：使用「最佳擬合」方法選擇之構架區(參見例如Sims等人 (1993) *J. Immunol.* 151 :2296)；源於輕鏈或重鏈可變區之特定子組之人類抗體的共同序列之構架區(參見例如Carter等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285；及Presta等人 (1993) *J. Immunol.*, 151:2623)；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如Almagro及Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633)；及由篩檢FR文庫獲得之構架區(參見例如Baca等人, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684及Rosok等人, (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618)。

非限制性示範性人類化抗體包括本文所述之 α FGFR2b。非限制性示範性無海藻糖基化人類化抗體包括本文所述之 α FGFR2bA，其與包含海藻糖之 α FGFR2b(亦稱為 α FGFR2bF)具有相同胺基酸序列。非限制性示範性無海藻糖基化人類化抗體亦包括包含 α FGFR2b之重鏈可變區及/或 α FGFR2b之輕鏈可變區的抗體。非限制性示範性無海藻糖基化人類化抗體包括包含重鏈可變區SEQ ID NO: 4及/或輕鏈可變區SEQ ID NO: 5之抗體。示範性人類化抗體亦包括但不限於包含 α FGFR2b之重鏈HVR1、HVR2及HVR3及/或輕鏈HVR1、HVR2及HVR3之人類化抗體。在一些實施例中，人類化抗FGFR2IIIb抗體包含上述HVR(亦即(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3)且結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，人類化抗FGFR2IIIb抗體包含上述HVR，結合FGFR2IIIb且具有至少一種選自以下之活性：增強之ADCC活性及增強之對Fc γ RIIIA(諸如Fc γ RIIIA(V158)及/或Fc γ RIIIA(F158))之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗

FGFR2IIIb抗體不結合FGFR2IIIc。

在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含 α FGFR2b之重鏈HVR1、HVR2及HVR3及/或輕鏈HVR1、HVR2及HVR3。非限制性示範性無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包括包含SEQ ID NO: 6、7及8中闡述之重鏈HVR1、HVR2及HVR3之集合的抗體。非限制性示範性無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體亦包括包含SEQ ID NO: 9、10及11中闡述之輕鏈HVR1、HVR2及HVR3之集合的抗體。

在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含含有與SEQ ID NO: 4至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的重鏈，其中該抗體結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含含有與SEQ ID NO: 5至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的輕鏈，其中該抗體結合FGFR2IIIb。在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含含有與SEQ ID NO: 4至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的重鏈；及含有與SEQ ID NO: 5至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之可變區序列的輕鏈；其中該抗體結合FGFR2IIIb。

在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含至少一個本文論述之HVR。亦即，在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含至少一個選自本文論述之重鏈HVR1、本文論述之重鏈HVR2、本文論述之重鏈HVR3、本文論述之輕鏈HVR1、本文論述之輕鏈HVR2及本文論述之輕鏈HVR3之HVR。此外，在一些實施

例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含至少一個基於本文論述之HVR的突變HVR，其中該突變HVR相對於本文論述之HVR包含1、2、3或4個胺基酸取代。在一些實施例中，一或多個胺基酸取代為保守性胺基酸取代。熟習此項技術者可為特定HVR序列選擇一或多個適合保守性胺基酸取代，其中預測該等適合保守性胺基酸取代不顯著改變包含突變HVR之抗體之結合性質。

示範性無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體亦包括與本文所述之抗體或其片段競爭結合FGFR2IIIb之抗體。因此，在一些實施例中，提供與 α FGFR2b競爭結合FGFR2IIIb之人類化抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，提供與 α FGFR2b競爭結合FGFR2IIIb，且具有至少一種選自以下之活性之無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體：增強之ADCC活性及增強之對Fc γ RIIIA(諸如Fc γ RIIIA(V158)及/或Fc γ RIIIA(F158))之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體不結合FGFR2IIIc。

在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體包含一或多個人類恆定區。在一些實施例中，人類重鏈恆定區具有選自IgA、IgG及IgD之同型。在一些實施例中，人類輕鏈恆定區具有選自 κ 及 λ 之同型。

在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化人類化抗體包含人類IgG恆定區。在一些實施例中，當效應物功能合乎需要時，選擇包含人類IgG1重鏈恆定區或人類IgG3重鏈恆定區之無海藻糖基化人類化抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化人類化抗體包含人類IgG1恆定區。在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化人類化抗體包含人類IgG1恆定區，其中N297未經海藻糖基化。在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化抗體包含人類IgG1恆定區及人類 κ 輕鏈。

在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗體包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 2之重鏈及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之輕鏈。在一些實施例中，無海藻糖基化人類化抗體包含由胺基酸序列SEQ ID NO: 2及任何轉譯後修飾組成之重鏈、及由胺基酸序列SEQ ID NO: 3及任何轉譯後修飾組成之輕鏈。

示範性抗體恆定區

在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化抗體包含一或多個人類恆定區。在一些實施例中，人類重鏈恆定區具有選自IgA、IgG及IgD之同型。在一些實施例中，人類輕鏈恆定區具有選自 κ 及 λ 之同型。

在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化抗體包含人類IgG恆定區。在一些實施例中，當效應物功能合乎需要時，選擇包含人類IgG1重鏈恆定區或人類IgG3重鏈恆定區之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化抗體包含人類IgG1恆定區。在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化抗體包含人類IgG1恆定區，其中N297未經海藻糖基化。在一些實施例中，本文所述之無海藻糖基化抗體包含人類IgG1恆定區及人類 κ 輕鏈。

在整篇本說明書及申請專利範圍中，除非明確陳述或為熟習此項技術者所知，否則免疫球蛋白重鏈中之殘基之編號為如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中之EU索引之編號，該參考資料以引用的方式明確併入本文中。「如Kabat中之EU索引」係指對人類IgG1 EU抗體之殘基編號。

在某些實施例中，本發明抗體包含相較於野生型IgG或野生型抗體之Fc區具有至少一個胺基酸取代的變異Fc區。在某些實施例中，變異Fc區具有野生型抗體之Fc區中之兩個或兩個以上胺基酸取代。在某些實施例中，變異Fc區具有野生型抗體之Fc區中之三個或三個以上胺基酸取代。

基酸取代。在某些實施例中，變異Fc區具有至少一個、兩個或三個或三個以上本文所述之Fc區胺基酸取代。在某些實施例中，本文變異Fc區將與天然序列Fc區及/或與親本抗體之Fc區具有至少約80%同源性。在某些實施例中，本文變異Fc區將與天然序列Fc區及/或與親本抗體之Fc區具有至少約90%同源性。在某些實施例中，本文變異Fc區將與天然序列Fc區及/或與親本抗體之Fc區具有至少約95%同源性。

在某些實施例中，改變本文提供之抗體以增加或降低抗體糖基化之程度。對抗體添加糖基化位點或使抗體缺失糖基化位點可藉由改變胺基酸序列以使得產生或移除一或多個糖基化位點來便利地達成。

當抗體包含Fc區時，可改變與其連接之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含通常藉由N-鍵聯連接於Fc區之CH2域之Asn297的分支雙觸角寡醣。參見例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺 (GlcNAc)、半乳糖及唾液酸、以及連接於雙觸角寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc的海藻糖。在一些實施例中，可對本發明之抗體中之寡醣進行修飾以產生具有某些改良性質之抗體。

在一個實施例中，提供具有缺乏(直接或間接)連接於Fc區之海藻糖之碳水化合物結構的抗體(亦即無海藻糖基化抗體)。舉例而言，包含複數種此等抗體之組合物中之海藻糖的量可為0%至約5%。在一些實施例中，包含複數種此等抗體之組合物包含至少95%無海藻糖基化抗體。海藻糖之量係藉由相對於連接於Asn297之所有糖結構(例如複合、雜交及高甘露糖結構)之總和計算在糖鏈內在Asn297處之海藻糖之平均量來測定。偵測抗體中之海藻糖之非限制性示範性方法包括MALDI-TOF質譜分析(參見例如WO 2008/077546)、HPLC量測釋放之螢光標記之寡醣(參見例如Schneider等人, 「N-Glycan analysis of monoclonal antibodies and other glycoproteins using UHPLC with

fluorescence detection,」 Agilent Technologies, Inc. (2012) ; Lines, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 14: 601-608 (1996) ; Takahasi, *J. Chrom.*, 720: 217-225 (1996))、毛細管電泳量測釋放之螢光標記之寡醣(參見例如 Ma等人, *Anal. Chem.*, 71: 5185-5192 (1999))、及採用脈衝電流偵測之 HPLC量測單醣組成(參見例如 Hardy,等人, *Analytical Biochem.*, 170: 54-62 (1988))。Asn297係指位於Fc區中約位置297(Fc區殘基之EU編號)處之天冬醯胺殘基；然而，Asn297亦可由於抗體中之微小序列變化而位於位置297之上游或下游約 ± 3 個胺基酸處，亦即在位置294與300之間。在本文所述之抗體 α FGFR2b中，Asn297係見於序列QYNST中，且在以下顯示之序列表SEQ ID NO: 2中用粗體表示並加下劃線。海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)；第US 2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。與「無海藻糖基化」或「海藻糖缺乏」抗體相關之公開案之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki等人 *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。能夠產生無海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化作用之Lec13 CHO細胞(Ripka等人 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號, Presta, L；及WO 2004/056312 A1，Adams等人，尤其在實例11中)及基因剔除細胞株，諸如缺乏功能性 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因FUT8之細胞株，例如基因剔除CHO細胞(參見例如 Yamane-Ohnuki等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人, *Biotechnol. Bioeng.*,⁵

94(4):680-688 (2006)；及WO2003/085107)。

進一步提供具有二等分寡醣之抗體，例如其中連接於抗體之Fc區之雙觸角寡醣係由GlcNAc二等分。此等抗體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能。此等抗體之實例例如描述於WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)；美國專利第6,602,684號(Umana等人)；及US 2005/0123546(Umana等人)中。亦提供在連接於Fc區之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基之抗體。此等抗體可具有改良之CDC功能。此等抗體例如描述於WO 1997/30087(Patel等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

亦提供具有胺基末端前導物延伸部分之抗體。舉例而言，胺基末端前導序列之一或多個胺基酸殘基存在於抗體之任何一或多個重鏈或輕鏈之胺基末端處。一示範性胺基末端前導物延伸部分包含以下或由以下組成：存在於抗體之一或兩個輕鏈上之三個胺基酸殘基VHS。

可分析人類FcRn高親和力結合多肽例如在投與具有變異Fc區之多肽之轉殖基因小鼠、人類、或非人類靈長類動物中的活體內或血清半衰期。亦參見例如Petkova等人 *International Immunology* 18(12):1759-1769 (2006)。

在本發明之一些實施例中，在人類效應細胞存在下，無海藻糖基化抗體比包含海藻糖之親本抗體更有效介導ADCC。通常，可使用如本文揭露之活體外ADCC分析測定ADCC活性，但涵蓋用於測定例如動物模型等中之ADCC活性之其他分析方法。

在某些實施例中，抗體之「 K_D 」、「 K_a 」、「 K_d 」或「 K_d 值」係藉由利用BIAcore®-2000或BIAcore®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)，在25°C下，用在約10反應單位(RU)下固定之抗原CM5晶片，使用表面電漿子共振分析所量測。簡言之，根據供應商說明書用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-

羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIACORE公司)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋至5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，隨後在流速5 $\mu\text{L/min}$ 下注射以達成約10反應單位(RU)之偶合蛋白質。在注射抗原之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應基團。對於動力學量測，在25°C下，在流速約25 $\mu\text{L/min}$ 下注射例如全長抗體之多肽於含0.05% TWEEN-20™界面活性劑(PBST)之PBS中的連續稀釋液。藉由同時擬合締合及解離感測器圖來使用簡單一對一朗繆爾結合模型(BIACORE®評估軟體第3.2版)計算締合速率($k_{\text{締合}}$)及離解速率($k_{\text{解離}}$)。平衡解離常數(K_d)係計算為比率 $k_{\text{解離}}/k_{\text{締合}}$ 。參見例如Chen等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若由以上表面電漿共振分析獲得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術來測定締合速率，該技術量測在如在分光計(諸如停流配備分光光度計(Aviv Instruments)或具有攪拌比色皿之8000系列 SLM-AMINCO™ 分光光度計(ThermoSpectronic))中量測之遞增濃度之抗原存在下，在25°C下於PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體之螢光發射強度(激發= 295 nm；發射= 340 nm，16 nm帶通)的增加或降低。

亦可如上所述利用 BIACORE®-2000 或 BIACORE®-3000 系統(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)測定抗體之「締合速率」或「 $k_{\text{締合}}$ 」。

在某些實施例中，該兩個值(例如 K_d 值)之間的差異實質上相同，例如小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%及/或小於約10%，隨參照/比較值而變。

在某些實施例中，該兩個值(例如 K_d 值)之間的差異實質上不同，例如大於約10%、大於約20%、大於約30%、大於約40%及/或大於約50%，隨參照/比較分子之值而變。

示範性前導序列

為使一些分泌蛋白質大量表現並分泌，來自異源蛋白質之前導序⁵

列可為合乎需要的。在一些實施例中，採用異源前導序列可為有利的，因為當前導序列在分泌過程期間於ER中移除時，所得成熟多肽可保持不變。添加異源前導序列可為表現並分泌一些蛋白質所需。

某些示範性前導序列例如描述於由新加坡國立大學生物化學系 (Department of Biochemistry, National University of Singapore) 維護之線上前導序列資料庫 (Leader sequence Database) 中。參見 Choo 等人, *BMC Bioinformatics*, 6: 249 (2005)；及 PCT 公開案第 WO 2006/081430 號。

III. 無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之性質

在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之活體外及/或活體內ADCC活性。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之活體外ADCC活性。在一些實施例中，活體外ADCC活性係藉由本文例如在實例3中所述之方法測定。簡言之，在存在海藻糖基化抗體或無海藻糖基化抗體下，使FGFR2IIIb表現細胞與新鮮分離之人類PBMC在效應細胞(PBMC)與目標細胞25:1之比率下接觸。在一些實施例中，表現FGFR2IIIb之Ba/F3細胞用作目標細胞。在一些實施例中，細胞毒性係藉由使用CytoTox非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI) 定量LDH釋放加以測定。在一些實施例中，最大溶解係使用5%曲通(Triton)X-100測定且在不存在抗體下測定自發性釋放。在一些實施例中，特異性溶解之百分比可使用以下公式確定： $(\text{實驗釋放} - \text{自發性釋放}) / (\text{最大釋放} - \text{自發性釋放}) \times 100 = \text{特異性溶解}\%$ 。在一些實施例中，在至少一種測試抗體濃度下，具有增強之ADCC活性之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體導致特異性溶解比用相同量之海藻糖基化抗體達成之特異性溶解大至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少60、至少65、至少70或至少75個百分點。在一些實施例中，具有增強

之ADCC活性之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體導致特異性溶解比用海藻糖基化抗體達成之特異性溶解大至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少60、至少65、至少70或至少75個百分點，其中各抗體處於0.01與1 $\mu\text{g/ml}$ 之間的濃度下且目標細胞為表現FGFR2IIIb之Ba/F3細胞。在一些實施例中，抗體係在0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 或 1 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度下加以測試。

在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA(F158)具有增強之親和力。在一些實施例中，抗體對Fc γ RIIIA之親和力係使用例如如本文在實例2中所述及/或如下之表面電漿子共振測定，該表面電漿子共振係關於Fc γ RIIIA(V158)加以描述，但其亦適於測定對Fc γ RIIIA(F158)之親和力。簡言之，在一些實施例中，將海藻糖基化或無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體捕捉在蛋白質A塗佈之葡聚糖晶片上。在各種濃度下注射Fc γ RIIIA(V158)(可自例如R&D Systems獲得)。可例如使用與表面電漿子共振系統一起提供之軟體(例如Biacore T200評估軟體1:1結合模型)測定Fc γ RIIIA(V158)對海藻糖基化及無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之締合常數、解離常數及親和力。在一些實施例中，對Fc γ RIIIA(諸如Fc γ RIIIA(V158)或Fc γ RIIIA(F158))之親和力增強之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體結合Fc γ RIIIA之親和力比海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體大至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少7倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍、至少17倍或至少20倍。舉例而言，若無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體結合Fc γ RIIIA(V158)之親和力(K_D)為9.2 nM且海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體結合Fc γ RIIIA(V158)之親和力(K_D)為207 nM，則無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體結合Fc γ

RIIIA(V158)之親和力比海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體大 $207/9.2=22.5$ 倍。

IV. 抗FGFR2IIIb抗體表現及產生

編碼抗FGFR2IIIb抗體之核酸分子

提供包含編碼抗FGFR2IIIb抗體之一或多個鏈之聚核苷酸的核酸分子。在一些實施例中，核酸分子包含編碼抗FGFR2IIIb抗體之重鏈或輕鏈之聚核苷酸。在一些實施例中，核酸分子包含編碼抗FGFR2IIIb抗體之重鏈之聚核苷酸與編碼抗FGFR2IIIb抗體之輕鏈之聚核苷酸兩者。在一些實施例中，第一核酸分子包含編碼重鏈之第一聚核苷酸且第二核酸分子包含編碼輕鏈之第二聚核苷酸。

在一些此等實施例中，重鏈及輕鏈係自一個核酸分子表現，或自兩個各別核酸分子表現為兩個各別多肽。在一些實施例中，諸如當抗體為scFv時，單一聚核苷酸編碼包含連接在一起之重鏈與輕鏈兩者之單一多肽。

在一些實施例中，編碼抗FGFR2IIIb抗體之重鏈或輕鏈之聚核苷酸包含編碼在轉譯時位於重鏈或輕鏈之N末端之前導序列的核苷酸序列。如上所論述，前導序列可為天然重鏈或輕鏈前導序列，或可為另一異源前導序列。

可使用此項技術中習知之重組DNA技術構築核酸分子。在一些實施例中，核酸分子為適於在所選寄主細胞中表現之表現載體。

載體

提供包含編碼抗FGFR2IIIb重鏈及/或抗FGFR2IIIb輕鏈之聚核苷酸的載體。亦提供包含編碼抗FGFR2IIIb重鏈及/或抗FGFR2IIIb輕鏈之聚核苷酸的載體。此等載體包括但不限於DNA載體、噬菌體載體、病毒載體、反轉錄病毒載體等。在一些實施例中，載體包含編碼重鏈之第一聚核苷酸序列及編碼輕鏈之第二聚核苷酸序列。在一些實施例

中，重鏈及輕鏈自載體表現為兩個各別多肽。在一些實施例中，重鏈及輕鏈表現為單一多肽之一部分，諸如當抗體為scFv時。

在一些實施例中，第一載體包含編碼重鏈之聚核苷酸且第二載體包含編碼輕鏈之聚核苷酸。在一些實施例中，第一載體及第二載體以類似量(諸如類似莫耳量或類似質量)轉染入寄主細胞中。在一些實施例中，莫耳比或質量比介於5:1與1:5之間的第一載體及第二載體轉染入寄主細胞中。在一些實施例中，使用編碼重鏈之載體與編碼輕鏈之載體之介於1:1與1:5之間的質量比。在一些實施例中，使用編碼重鏈之載體與編碼輕鏈之載體之1:2之質量比。

在一些實施例中，選擇針對多肽在CHO或CHO源性細胞中或在NSO細胞中之表現加以最佳化之載體。示範性此等載體例如描述於Running Deer等人, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004)中。

寄主細胞

在各種實施例中，抗FGFR2IIIb重鏈及/或抗FGFR2IIIb輕鏈可在諸如細菌細胞之原核細胞中；或在諸如真菌細胞(諸如酵母)、植物細胞、昆蟲細胞及哺乳動物細胞之真核細胞中表現。此表現可例如根據此項技術中已知之程序來進行。可用於表現多肽之示範性真核細胞包括但不限於COS細胞，包括COS 7細胞；293細胞，包括293-6E細胞；CHO細胞，包括CHO-S、DG44、Lec13 CHO細胞及FUT8 CHO細胞；PER.C6[®]細胞(Crucell)；及NSO細胞。在一些實施例中，抗FGFR2IIIb重鏈及/或抗FGFR2IIIb輕鏈可在酵母中表現。參見例如美國公開案第US 2006/0270045 A1號。在一些實施例中，基於特定真核寄主細胞能夠對抗FGFR2IIIb重鏈及/或抗FGFR2IIIb輕鏈進行所要轉譯後修飾來對其進行選擇。舉例而言，在一些實施例中，CHO細胞產生唾液酸化程度高於293細胞中產生之相同多肽的多肽。

將一或多個核酸引入所要寄主細胞中可藉由任何方法來達成，⁵

該方法包括但不限於磷酸鈣轉染、DEAE-葡聚糖介導之轉染、陽離子脂質介導之轉染、電穿孔、轉導、感染等。非限制性示範性方法例如描述於Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第3版 Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)中。可根據任何適合方法使核酸短暫或穩定轉染於所要寄主細胞中。

在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係在能夠產生無海藻糖基化抗體之細胞中產生，該等細胞諸如缺乏蛋白質海藻糖基化作用之Lec13 CHO細胞(Ripka等人 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號, Presta, L；及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其在實例11中)及基因剔除細胞株，諸如缺乏功能性 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因FUT8之細胞株，例如基因剔除CHO細胞(參見例如Yamane-Ohnuki等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及WO2003/085107)。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係在缺乏功能性FUT8基因之CHO細胞中產生。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係在Potelligent® CHOK1SV細胞(BioWa/Lonza, Allendale, NJ)中產生。

純化抗FGFR2IIIb抗體

可藉由任何適合方法純化抗FGFR2IIIb抗體。此等方法包括但不限力基質或疏水性相互作用層析。適合親和配體包括FGFR2IIIb ECD及結合抗體恆定區之配體。舉例而言，蛋白質A、蛋白質G、蛋白質A/G或抗體親和管柱可用於結合恆定區且純化抗FGFR2IIIb抗體。疏水性相互作用層析(例如丁基或苯基管柱)亦可適於純化一些多肽。許多純化多肽之方法在此項技術中為已知的。

無細胞產生抗FGFR2IIIb抗體

在一些實施例中，在無細胞系統中產生抗FGFR2IIIb抗體。非限

制性示範性無細胞系統例如描述於Sitaraman等人, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo等人, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)中。

V. 治療組合物及方法

使用抗FGFR2IIIb抗體治療疾病之方法

提供本發明抗體及包含本發明抗體之組合物以用於人類或動物之治療方法中。亦提供治療疾病之方法，其包含投與無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。可用無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體治療之非限制性示範性疾病包括但不限於癌症。在一些實施例中，提供治療癌症之方法，其包含投與無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。在一些實施例中，癌症係選自胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌或食道癌。在一些實施例中，提供治療胃癌之方法，其包含投與無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。

在一些實施例中，癌症包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，包含FGFR2基因擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之癌症表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表現量。在一些實施例中，癌症過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，胃癌包含FGFR2基因擴增。在一些實施例中，包含FGFR2基因擴增之胃癌過度表現FGFR2IIIb。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之胃癌過度表現FGFR2IIIb之程度大於FGFR2IIIc。在一些實施例中，包含FGFR2擴增之胃癌表現FGFR2IIIb之校正量比FGFR2IIIc表現之校正量大超過2倍、3倍、5倍或10倍。在一些實施例中，相對於GUSB校正表現量。在一些實施例中，胃癌過度表現FGFR2IIIb，但不包含FGFR2基因擴增。

增。在一些實施例中，過度表現為mRNA過度表現。在一些實施例中，過度表現為蛋白質過度表現。

可藉由此項技術中之任何適合方法，包括但不限於原位雜交(ISH)來確定FGFR2IIIb基因擴增。在一些實施例中，FGFR2擴增包含FGFR2:CEN10(染色體10著絲粒)比率>3。

可藉由此項技術中之任何適合方法，包括但不限於包含定量PCR(qPCR)之方法來確定FGFR2IIIb mRNA過度表現。術語「FGFR2IIIb mRNA過度表現」意謂FGFR2IIIb mRNA之含量升高，而無論此含量升高之原因如何(亦即無論含量升高為轉錄增加及/或mRNA之降解降低、其他機制或機制之組合之結果)。

可藉由此項技術中之任何適合方法，包括但不限於諸如免疫組織化學(IHC)之抗體基方法來確定FGFR2IIIb蛋白質過度表現。在一些實施例中，IHC染色係根據此項技術中之方法加以計分。術語「FGFR2IIIb蛋白質過度表現」意謂FGFR2IIIb蛋白質之含量升高，而無論此含量升高之原因如何(亦即無論含量升高為轉譯增加及/或蛋白質之降解降低、其他機制或機制之組合之結果)。在一些實施例中，根據IHC，1+、2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，根據IHC，2+或3+腫瘤細胞染色指示FGFR2IIIb過度表現。在一些實施例中，如實例6中所述對IHC染色計分。

醫藥組合物

在各種實施例中，以具有廣泛多種醫藥學上可接受之載劑之調配物形式提供包含無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之組合物(參見例如 Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 第20版 (2003)；Ansel等人, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 第7版, Lippencott Williams and Wilkins (2004)；Kibbe等人, *Handbook of*

Pharmaceutical Excipients, 第3版, Pharmaceutical Press (2000))。包括媒劑、佐劑及稀釋劑之各種醫藥學上可接受之載劑為可用的。此外，諸如pH值調整劑及緩衝劑、張力調整劑、穩定劑、濕潤劑及其類似物之各種醫藥學上可接受之輔助物質亦為可用的。非限制性示範性載劑包括生理食鹽水、緩衝生理食鹽水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其組合。

在各種實施例中，可藉由將無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體溶解、懸浮或乳化於水性或非水性溶劑，諸如植物油或其他油、合成脂族酸甘油酯、高級脂肪酸之酯、或丙二醇中；且必要時與習知添加劑，諸如增溶劑、等張劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑及防腐劑一起來調配用於注射，包括皮下投藥之包含無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體之組合物。在各種實施例中，可例如使用加壓可接受之推進劑(諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣及其類似物)調配用於吸入之組合物。在各種實施例中，組合物亦可諸如與生物可降解或非生物可降解聚合物一起調配成持續釋放微膠囊。一非限制性示範性生物可降解調配物包括聚乳酸-乙醇酸聚合物。一非限制性示範性非生物可降解調配物包括聚甘油脂肪酸酯。製備此等調配物之某些方法例如描述於EP 1 125 584 A1中。

投藥途徑

在各種實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體可藉由各種途徑活體內投與，該等途徑包括但不限於經口、動脈內、非經腸、鼻內、肌肉內、心內、室內、氣管內、經頰、經直腸、腹膜內、皮內、表面、經皮及鞘內或另外藉由植入或吸入。標的組合物可調配成固體、半固體、液體或氣體形式之製劑；包括但不限於錠劑、膠囊、散劑、顆粒、軟膏劑、溶液、栓劑、灌腸劑、注射液、吸入劑及氣霧劑。可根據預定應用選擇適當調配物及投藥途徑。

醫藥組合物係以有效治療或防治癌症之量投與，該癌症諸如胃

癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌或食道癌。治療有效量通常取決於所治療受試者之重量、其身體或健康狀況、欲治療病狀之廣泛性或所治療受試者之年齡。一般而言，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體可以在每劑每公斤體重約10 µg至每公斤體重約100 mg之範圍內之量投與。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體可以在每劑每公斤體重約50 µg至每公斤體重約5 mg之範圍內之量投與。在一些實施例中，抗FGFR2IIIb抗體可以在每劑每公斤體重約100 µg至每公斤體重約10 mg之範圍內之量投與。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體可以在每劑每公斤體重約100 µg至每公斤體重約20 mg之範圍內之量投與。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體可以在每劑每公斤體重約0.5 mg至每公斤體重約20 mg之範圍內之量投與。

無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體組合物可按需要向受試者投與。可由熟習此項技術者，諸如主治醫師基於以下考慮對投藥頻率作出決定：所治療病狀、所治療受試者之年齡、所治療病狀之嚴重性、所治療受試者之一般健康狀況及其類似因素。在一些實施例中，向受試者投與有效劑量之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體一或多次。在各種實施例中，一個月一次、少於一個月一次(諸如每兩個月或每三個月)向受試者投與有效劑量之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。在其他實施例中，多於一個月一次(諸如每兩週或每週)投與有效劑量之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。向受試者投與有效劑量之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體至少一次。在一些實施例中，可多次投與有效劑量之無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，包括持續至少一個月、至少六個月或至少一年之時期。

組合療法

可單獨或與其他治療模式一起投與無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗

體。其可在其他治療模式，例如手術、化學療法或放射療法之前、實質上與之同時或之後提供。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係連同另一抗癌劑一起投與。可與無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體一起投與之非限制性示範性抗癌劑包括鉑藥劑(諸如順鉑、奧沙利鉑及卡鉑)、太平洋紫杉醇(TAXOL®)、太平洋紫杉醇之白蛋白工程改造之奈米粒子調配物(ABRAXANE®)、多西他賽(TAXOTERE®)、吉西他濱(GEMZAR®)、卡培他濱(XELODA®)、伊立替康(CAMPTOSAR®)、表柔比星(ELLENCE®、PHARMORUBICIN®)、FOLFOX(奧沙利鉑與5-FU及甲醯四氫葉酸組合)、FOLFIRI(甲醯四氫葉酸、5-FU及伊立替康之組合)、甲醯四氫葉酸、氟尿嘧啶(5-FU、EFUDEX®)、絲裂黴素C(MITOZYTREX™、MUTAMYCIN®)及小紅莓鹽酸鹽(阿德力黴素(Adriamycin)PFS、阿德力黴素RDF、RUBEX®)。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係連同太平洋紫杉醇一起投與。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係連同順鉑及/或5-FU一起投與。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係連同順鉑及5-FU一起投與。在一些實施例中，無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體係連同FOLFOX(奧沙利鉑、5-FU及甲醯四氫葉酸)一起投與。

套組/製品

本發明亦提供用於本文所述之任何方法中之套組、藥品、組合物及單位劑型。

本發明之套組包括一或多個包含無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體(或單位劑型及/或製品)之容器。在一些實施例中，提供單位劑量，其中該單位劑量含有預定量之包含無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，有或無一或多種其他藥劑之組合物。在一些實施例中，該種單位劑量係供應於用於注射之單次使用預填充注射器中。在各種實施例中，單位劑

量中含有之組合物可包含生理食鹽水、蔗糖或其類似物；緩衝劑，諸如磷酸鹽或其類似物；及/或在穩定且有效pH值範圍內調配。或者，在一些實施例中，組合物可以可在添加適當液體(例如無菌水)後復原之凍乾粉末形式提供。在一些實施例中，組合物包含一或多種抑制蛋白質聚集之物質，包括但不限於蔗糖及精胺酸。在一些實施例中，本發明之組合物包含肝素(heparin)及/或蛋白多醣。

在一些實施例中，本發明之套組進一步包含根據本文所述之任何方法治療例如癌症(諸如胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌或食道癌)之使用說明書。套組可進一步包含對選擇適合治療之個體之描述。本發明之套組中供應之說明書通常為書寫在標籤或包裝插頁(例如包括在套組中之紙片)上之說明書，但機器可讀說明書(例如在磁性儲存盤或光學儲存盤上攜帶之說明書)亦為可接受的。在一些實施例中，套組進一步包含另一治療劑。

本發明之套組處於適合包裝狀態。適合包裝包括但不限於小瓶、瓶、廣口瓶、可撓性包裝(例如密封美拉(Mylar)或塑膠袋)及其類似物。套組可視情況提供其他組分，諸如緩衝劑及解釋性資訊。因此，本申請案亦提供製品，其包括小瓶(諸如密封小瓶)、瓶、廣口瓶、可撓性包裝及其類似物。

實例

以下論述之實例僅意欲示範本發明且不應視為以任何方式限制本發明。實例不意欲表示以下實驗為進行之全部或僅有實驗。已努力確保關於所用數值(例如量、溫度等)之準確性，但應考慮一些實驗誤差及偏差。除非另外指示，否則份數為重量份數，分子量為重量平均分子量，溫度以攝氏度計，且壓力為大氣壓或接近大氣壓。

實例1：產生無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體。

構築表現載體。根據製造商說明書將編碼單株抗體 α FGFR2b之重

鏈(HC)及輕鏈(LC)之核苷酸序列選殖至GS基因表現系統(Lonza, Basel, Switzerland)中。該系統產生含有輕鏈與重鏈兩者之表現卡匣之雙重基因載體(DGV)。

選擇寄主細胞株。為產生無海藻糖基化單株抗體 α FGFR2bA(在 α FGFR2b之後的符號「A」係指「無海藻糖基化」)，選擇Potelligent® CHOK1SV細胞(BioWa/Lonza, Allendale, NJ)作為寄主細胞株。Potelligent® CHOK1SV細胞缺乏FUT8基因(α 1,6-海藻糖基轉移酶)且因此產生無海藻糖抗體(無海藻糖基化抗體)。

構築用於產生無海藻糖基化 α FGFR2bA抗體之穩定細胞株：根據製造商說明書，藉由電穿孔將上述包含編碼 α FGFR2b抗體重鏈及輕鏈之核苷酸序列的表現載體轉染至Potelligent® CHOK1SV細胞中。將電穿孔細胞於無L-麩醯胺酸之CD CHO培養基中在約10,000個細胞/50 μ l/孔下接種至96孔盤中。次日在150 μ l/孔下添加含有67 μ M L-甲硫胺酸磺基脲(MSX, SIGMA目錄號M5379, St. Louis, MO)之選擇性CD CHO培養基。用IN細胞分析器2000(GE Healthcare, Piscataway, NJ)監測細胞生長及純系形成。

在4-6週之後，使用XL665結合之蛋白質A及穴狀化合物結合之多株兔IgG(Cisbio, Bedford, MA)，相對於用純化 α FGFR2b抗體產生的標準曲線，利用均質時間解析螢光(HTRF)基分析篩檢表現 α FGFR2bA抗體之存活菌落。經由一系列規模遞增之產生過程擴增最高表現性純系，該等過程包括24孔盤、旋轉管、振盪燒瓶、小型生物反應器及最終平台產生過程。在各步驟時，僅將包含最高表現性純系之子組取至下一過程。基於對蛋白質產物效價、細胞生長特徵、產物品質、穩定性以及生物反應器中之可縮放性之評估選擇最終產生純系。最終產生株系之 α FGFR2bA表現量為約3.5 g/L。使用正相HPLC(N-HPLC)層析確認在最終產生細胞株中產生之 α FGFR2bA中缺乏海藻糖基化。

藉由管柱層析純化 α FGFR2bA抗體且超濾以濃縮純化物質，接著滲濾以交換至調配緩衝液(20 mM組胺酸、150 mM L-精胺酸、0.01%聚山梨醇酯20(polysorbate 20)，pH 6.0)中。將抗體儲存在低於-70℃下。

藉由使聚糖自蛋白質釋放，用鄰胺苯甲酸(2-AA)標記聚糖，且接著純化經標記聚糖來對 α FGFR2bA進行聚糖分析。採用螢光偵測之正相HPLC用於分離聚糖且量測抗體中各聚糖之相對量。圖7顯示由Potelligent® CHOK1SV細胞株產生之 α FGFR2b及由CHOK1SV產生之 α FGFR2b具有兩種不同聚糖分佈。(A)由Potelligent® CHOK1SV細胞株產生之 α FGFR2b之聚糖分佈顯示抗體缺乏海藻糖(「G0」)。(B)由CHOK1SV細胞株產生之 α FGFR2b之聚糖分佈顯示抗體含有海藻糖(「G0F」)。

使用兩種正交方法鑒定由正相HPLC分離獲得之聚糖峰。首先，標記Potelligent® CHOK1SV產生之 α FGFR2b且使用正相HPLC方法分離。在螢光偵測之後，使聚糖穿過QTrap質譜儀。測定各峰之質量並用於確定地鑒定各聚糖，且顯示於表2中。

表2：聚糖峰之質量

聚糖	理論質量(Da)	觀測質量(Da)
G0	1437	1437.4
Man-5	1355	1355.3
G1	1600	1599.4

亦在Potelligent® CHOK1SV產生之 α FGFR2b中搜尋聚糖之各海藻糖基化形式(G0F、G1F及G2F)之質量且未觀測到。圖8顯示通常在抗體中觀測之G0、G1、G2、G0F、G1F、G2F及甘露糖-5(或Man-5)聚糖結構之示意圖。

亦使用自Prozyme購買之聚糖標準物且匹配標準物與來自Potelligent® CHOK1SV細胞株與CHOK1SV細胞株兩者之 α FGFR2概況

之間的滯留時間來確認由HPLC分析獲得之峰身份。此等標準物能夠鑒定G0、G0F、Man5、G1、G1F及G2F。

來自 HPLC 分析之結果以及表徵資料確認在由 Potelligent® CHOK1SV細胞株產生之αFGFR2中缺乏海藻糖基化。

實例2：無海藻糖基化抗FGFR2b抗體結合親和力。

藉由表面電漿子共振測定αFGFR2bA及αFGFR2bF(在αFGFR2b之後的符號「F」係指「海藻糖基化」)對Fc γ RIIIA(V158)之結合親和力。簡言之，使用胺偶合套組(GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)以及於100 mM硼酸鈉緩衝液(pH 8.0)(Sigma, St. Louis, MO)中之100 mM乙二胺(Sigma)作為阻斷試劑來使蛋白質A共價連接於葡聚糖晶片。在各別流動槽上捕捉約600-800RU之αFGFR2bA及αFGFR2bF且蛋白質A(Pierce)衍生化流動槽充當參照對照。於HBS-P+操作緩衝液(Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ)中稀釋Fc γ RIIIA(V158)(R&D Systems, Minneapolis, MN)且一式兩份在5種濃度(0 nM、12.3 nM、37 nM、111 nM、333 nM及1000 nM)下注射。使用Biacore T200評估軟體1:1結合模型計算對αFGFR2bA之締合常數、解離常數及親和力。使用Biacore T200評估軟體穩態親和力模型測定αFGFR2bF結合之親和力常數。結果顯示於表3中。

表3：αFGFR2bA及αFGFR2bF抗體對Fc γ RIIIA(V158)之親和力

αFGFR2b	K _D (k _d /k _a) (nM)	k _a (1/Ms) x 10 ³	k _d (1/ms)
A	9.2	940.1	8.6
F	207	--	--

如表3中所示，Fc γ RIIIA(V158)結合αFGFR2bA之親和力比其結合αFGFR2bF大超過20倍。

實例3：無海藻糖基化抗FGFR2b抗體ADCC活性。

進行活體外分析以相對於αFGFR2bF抗體測定αFGFR2bA抗體之

ADCC 活性。如下產生 Ba/F3 FGFR2IIIb 表現目標細胞。將自 Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ, 目錄號ACC300, Braunschweig, Germany) 獲得之 Ba/F3細胞維持在補充有10%胎牛血清(Mediatech, 目錄號35-010-CV)、1 ng/mL鼠類IL-3(Peprotech, 目錄號213-13, Rocky Hill, NJ)、1X BME(Invitrogen, 目錄號1047574, Grand Island, NY)及1X青黴素-鏈黴素(Mediatech目錄號 30-002-C1)之RPMI(Mediatech, 目錄號10-041-CV, Manassas, VA)中。遵循製造商方案, 使用Cell Line Nucleofector®套組V(Lonza, 目錄號VCA-1003)用表現FGFR2IIIb之表現載體pBNew-hFGFR2b轉染Ba/F3細胞。pBNew載體含有CAG啟動子以及雞 β -肌動蛋白(β -actin)內含子及胺苄青黴素及嘌呤黴素(puromycin)生長選擇基因。在完全生長培養基中孵育經轉染細胞3天, 接著用2 μ g/mL嘌呤黴素(InVivoGen, 目錄號ant-pr-1, San Diego, CA)處理。在整個培養期間皆維持嘌呤黴素選擇。為產生個別穩定純系, 在每3個孔1種細胞之密度下塗鋪細胞。用抗FGFR2IIIb抗體進行之螢光活化細胞揀選(FACS)用於選擇FGFR2IIIb表現量最高之純系。

MFM-223細胞係自Health Protection Agency, UK獲得; OCUM-2M細胞係自Osaka City University, Osaka, Japan獲得; 且KATO III細胞係自ATCC, Rockville, MD獲得。所有細胞皆使用標準方法加以培養。自健康供體新鮮分離之PMBC係自AllCells, Emeryville, CA獲得。

在不同3天使用來自3個獨立供體之效應細胞進行ADCC分析。使用新鮮分離之人類PBMC作為效應細胞, 在效應細胞與目標細胞(E/T)比率25:1下來進行ADCC分析測試。在效應物及遞增濃度之抗體存在下孵育目標細胞16小時。使用2種陽性對照抗體(即關於SKOV-3目標細胞之HERCEPTIN®及關於Raji目標細胞之RITUXIN®)驗證ADCC分

析。完全人類IgG1陰性對照抗體(Eureka Therapeutics，目錄ET901，Emeryville, CA)用於非特異性細胞之細胞毒性。藉由根據製造商說明書(CytoTox非放射性細胞毒性分析，Promega, Madison, WI)定量LDH釋放來測定細胞毒性。

在5%曲通X-100存在下測定最大溶解，且在不存在抗體下測定自發性釋放。如下將特異性溶解之百分比計算為最大溶解減去自發性釋放之百分比：

$(\text{實驗釋放} - \text{自發性釋放}) / (\text{最大釋放} - \text{自發性釋放}) \times 100 = \text{特異性溶解}\%$

Ba/F3細胞之結果顯示於圖1中。在FGFR2IIIb表現Ba/F3細胞中，無海藻糖基化 α FGFR2bA抗體誘導之特異性溶解大於海藻糖基化 α FGFR2bF抗體。在OCUM-2M、MFM 223及KATO III細胞中， α FGFR2bA顯示在較低濃度下ADCC活性大於 α FGFR2bF，但在OCUM-2M及MFM 223細胞中，抗體之最大特異性溶解為類似的(資料未顯示)。此外，在FGFR2IIIc表現Ba/F3細胞中， α FGFR2b顯示少許至無ADCC活性。參見圖1A。

實例4：無海藻糖基化抗FGFR2b抗體在胃癌及乳癌異種移植物模型中之活性。

6週齡雌性CB17 SCID小鼠係自Charles River Laboratories(Wilmington, MA)購買且在開始研究之前馴化1週。人類胃癌細胞株OCUM-2M或乳癌細胞株MFM-223用作腫瘤模型。OCUM-2M係自Public University Corporation Osaka City University(OCU, Osaka, Japan)購買，且MFM-223係自Culture Collections, Public Health England(98050130, HPA Culture Collections, Salisbury, UK)購買。在完全生長培養基中培養細胞多達3代以進行植入擴增。分別在杜貝卡氏最低必需培養基(Dulbecco's Minimum^S

Essential Medium , DMEM) 及最低必需培養基 (MEM) 中培養 OCUM-2M及MFM-223細胞。所有培養基皆補充以10%熱失活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸及青黴素-鏈黴素溶液。使細胞在37°C下在含濕氣氛圍中在5% CO₂下生長。

當培養細胞達到85-90%匯合時，收集細胞且再懸浮於含有50%基質膠之無Ca²⁺及Mg²⁺之冷磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)(BD BioSciences, San Jose, CA)中。將OCUM-2M細胞在5x10⁵個細胞/100 µl/小鼠下在小鼠之右側腹上加以皮下植入。將MFM-223細胞在5x10⁵個細胞/100 µl/小鼠下在小鼠之右側腹上加以皮下植入，且將0.72 mg 90天釋放17-β雌二醇丸粒(Innovative Research of America, Sarasota, FL)皮下接種至右側腹中。在細胞植入之後每週兩次監測小鼠之腫瘤生長。根據以下公式量測腫瘤尺寸：腫瘤尺寸(mm³) = (寬度(mm) x 長度(mm)²)/2。當MFM-223腫瘤達到80 mm³時，揀選並隨機化(n = 10)小鼠，且啟始治療。對於OCUM-2M腫瘤，一旦腫瘤達到平均尺寸100 mm³，即啟始用抗FGFR2b之單藥療法，且一旦腫瘤達到平均尺寸250 mm³，即啟始組合療法。

如圖例中所指定，經由腹膜內注射每週兩次在1至10 mg/kg之範圍內之劑量下投與抗FGFR2IIIb人類化抗體(無海藻糖基化αFGFR2bA；海藻糖基化αFGFR2bF)或作為陰性對照之白蛋白。經由腹膜內注射每週兩次在12 mg/kg(對於太平洋紫杉醇)、2.3 mg/kg(對於氟尿嘧啶(5-FU))及33 mg/kg(對於順鉑)下投與化學治療劑。在啟始療法後，每週兩次量測各小鼠中之腫瘤尺寸。使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據以上公式計算腫瘤尺寸。當皮下腫瘤體積超過2000 mm³時或當腫瘤變得過度壞死時，使小鼠安樂死。

若 $P < 0.05$ ，則將作為結果之腫瘤體積比較確定為統計顯著。使用在量測腫瘤所處之最後一天計算之腫瘤體積的不成對雙尾t檢定分

析來計算 P 值。

圖 2 顯示 α FGFR2bA 及 α FGFR2bF 在 (A 及 B) 10 mg/kg 及 (C 及 D) 3 mg/kg 下在具有 FGFR2 擴增之 OCUM-2M 人類胃癌異種移植模型中的功效。(A) 在 10 mg/kg 下，海藻糖基化抗體與無海藻糖基化抗體兩者均誘導即刻腫瘤消退。然而，無海藻糖基化 α FGFR2bA 誘導之反應比海藻糖基化 α FGFR2bF 更持久。(B) 無海藻糖基化 α FGFR2bA 相較於海藻糖基化 α FGFR2bF 顯著降低最終 OCUM-2M 腫瘤尺寸 ($p=0.0153$)。經由雙尾不成對 t 檢定確定統計顯著性。(C) 當在 3 mg/kg 下給藥時，無海藻糖基化 α FGFR2bA 相較於海藻糖基化 α FGFR2bF 使腫瘤生長降低。實際上，無海藻糖基化 α FGFR2bA 相較於海藻糖基化 α FGFR2bF 誘導更大程度腫瘤消退及持久反應(注意：在約第 42 天自 α FGFR2bF 組移除 1 個動物，從而導致曲線移動)。(D) 無海藻糖基化 α FGFR2bA 在 3 mg/kg 下相較於海藻糖基化 α FGFR2bF 使最終 OCUM-2M 腫瘤尺寸顯著降低 ($p=0.0767$)。經由雙尾不成對 t 檢定確定統計顯著性。

圖 3 顯示由 α FGFR2bA 達成之劑量依賴性腫瘤抑制。(A) 當平均腫瘤尺寸達到約 100 mm³ 時，攜帶皮下 OCUM-2M 異種移植之 SCID 小鼠用 1、1.5、2、3 或 5 mg/kg 無海藻糖基化 α FGFR2bA 治療。儘管所有劑量之無海藻糖基化 α FGFR2bA 皆抑制腫瘤生長，但觀測到在 3 及 5 mg/kg 下，抑制作用及持久反應最大，其中在 2、1.5 及 1 mg/kg α FGFR2bA 下觀測到生長抑制降低。(B) 無海藻糖基化 α FGFR2bA 使最終 OCUM-2M 腫瘤尺寸降低，其中較高劑量顯示生長抑制更強力。對於所有劑量而言，腫瘤生長抑制皆具有統計顯著性 (5 mg/kg, $p<0.0001$; 3 mg/kg, $p<0.0001$; 2 mg/kg, $p<0.0001$; 1.5 mg/kg, $p = 0.0003$; 1 mg/kg, $p = 0.0013$)。經由雙尾不成對 t 檢定確定統計顯著性。

圖 4 顯示藉由用無海藻糖基化 α FGFR2bA 投藥，太平洋紫杉醇在^S

OCUM-2M胃癌異種移植模型中之抗腫瘤活性增強。(A) 當平均腫瘤尺寸達到約 285 mm^3 時，攜帶皮下OCUM-2M異種移植植物之SCID小鼠用無海藻糖基化 α FGFR2bA(5 mg/kg)、太平洋紫杉醇(12 mg/kg)或兩者之組合治療。相較於單獨 α FGFR2bA或太平洋紫杉醇，組合無海藻糖基化 α FGFR2bA與太平洋紫杉醇使腫瘤尺寸降低。(B)相較於單獨太平洋紫杉醇($p = 0.0005$)或 α FGFR2bA($p = 0.0009$)，組合 α FGFR2bA/太平洋紫杉醇療法使最終OCUM-2M腫瘤尺寸顯著降低。經由雙尾不成對t檢定確定統計顯著性。

圖5顯示藉由用無海藻糖基化 α FGFR2bA投藥，順鉑/5-FU在OCUM-2M胃癌異種移植模型中之抗腫瘤活性增強。(A)當平均腫瘤尺寸達到約 260 mm^3 時，攜帶皮下OCUM-2M異種移植植物之SCID小鼠用無海藻糖基化 α FGFR2bA(5 mg/kg)、氟尿嘧啶(5-FU)加順鉑(分別為2.3及33 mg/kg)、或三者之組合治療。相較於單獨 α FGFR2bA或5-FU/順鉑，組合無海藻糖基化 α FGFR2bA與5-FU/順鉑使腫瘤尺寸降低。(B)相較於5-FU/順鉑，組合 α FGFR2bA/5-FU/順鉑療法使最終OCUM-2M腫瘤尺寸顯著降低($p = 0.0003$)。相較於單獨 α FGFR2bA，由組合 α FGFR2bA/5-FU/順鉑療法達成之腫瘤尺寸降低增加為顯著的，但非統計顯著的。經由雙尾不成對t檢定確定統計顯著性。

圖6顯示 α FGFR2bA在MFM-223人類乳癌異種移植模型中之功效。(A) 將作為一種具有FGFR2擴增之人類乳癌細胞株之MFM-223皮下植入SCID小鼠中，且當平均腫瘤尺寸達到約 80 mm^3 時啟始無海藻糖基化 α FGFR2bA療法。相較於白蛋白對照(5 mg/kg)，無海藻糖基化 α FGFR2bA(5 mg/kg)顯著降低MFM-223腫瘤之生長。(B)相較於白蛋白對照，無海藻糖基化 α FGFR2bA顯著降低最終MFM-223腫瘤尺寸($p = 0.0008$)。經由雙尾不成對t檢定確定統計顯著性。

實例5：無海藻糖基化抗FGFR2b抗體介導之ADCC大於海藻糖基化抗

FGFR2b抗體。

進行活體外分析以相對於αFGFR2bF抗體測定αFGFR2bA抗體之ADCC活性。如之前所述產生Ba/F3 FGFR2IIIb表現目標細胞。OCUM-2M細胞係自Osaka City University, Osaka, Japan獲得。所有細胞皆使用標準方法加以培養。自健康供體新鮮分離之PMBC係自AllCells, Emeryville, CA獲得。

使用新鮮分離之人類PBMC作為效應細胞，在效應細胞與目標細胞(E:T)比率25:1下來進行ADCC分析。在效應物及遞增濃度之抗體存在下孵育目標細胞16小時。所有條件皆一式三份加以測試。藉由根據製造商推薦(Promega之CytoTox非放射性細胞毒性分析)定量LDH釋放來測定細胞毒性。對於OCUM-2M細胞，在5%曲通X-100存在下測定最大溶解，且在不存在抗體下測定自發性釋放。如下將特異性溶解之百分比計算為最大溶解減去自發性釋放之百分比： $(實驗釋放 - 自發性釋放) / (最大釋放 - 自發性釋放) \times 100 = 特異性溶解\%$ 。GraphPad軟體曲線擬合分析用於獲得EC50值。

Ba/F3細胞之結果顯示於圖9中。在FGFR2IIIb表現Ba/F3細胞中，無海藻糖基化αFGFR2bA抗體顯示效能高於(在較低濃度下，ADCC活性較大)海藻糖基化αFGFR2bF抗體。針對OCUM-2M細胞之類似結果顯示於圖10中。表4顯示在圖9及10中所示之兩種不同細胞株中，無海藻糖基化抗FGFRb抗體相較於海藻糖基化抗FGFR2b抗體之效能倍數增加。

表4：無海藻糖基化抗FGFR2b抗體相對於海藻糖基化抗FGFR2b抗體之效能倍數增加

細胞	EC50 (ng/mL)		
	αFGFR2bA	αFGFR2bF	αFGFR2bA之效能倍數增加
OCUM-2M	5	30	6
BaF3	2	16	8
FGFR2b			

實例6：免疫組織化學偵測腫瘤組織中之FGFR2IIIb蛋白。

包含GAL-FR21之鼠類可變區(參見美國專利第8,101,723 B2號)及鼠類IgG2a恆定區的鼠類 α FGFR2b抗體用於偵測福馬林固定之石蠟包埋(FFPE)胃腫瘤組織中之FGFR2IIIb蛋白。FFPE腫瘤組織用二甲苯及遞減濃度之乙醇連續洗滌來去石蠟且用水再水合5分鐘。將載片封裝之組織切片浸漬於0.1 mM檸檬酸鹽緩衝液(pH 6.0)中，加熱至95-99℃，持續15分鐘。冷卻組織切片並使其在室溫下與3% H₂O₂接觸5分鐘，且接著於TBST(0.05M Tris、0.15M NaCl、0.05%吐溫20)中洗滌兩次並在室溫下於阻斷緩衝液(含2.5%正常馬血清之TBST)中阻斷30分鐘。接著在室溫下使組織切片與5 μ g/ml α FGFR2b抗體一起在阻斷緩衝液中培育30分鐘。30分鐘與2小時之間的培育時間產生類似染色強度。在用TBST緩衝液洗滌3次之後，在室溫下使組織切片與備用(RTU)生物素化二級馬抗小鼠抗體(10 μ g/ml，於阻斷緩衝液中稀釋)(Vector Laboratories, Burlingame, CA；目錄號PK-7200)一起培育30分鐘。組織切片用TBST緩衝液洗滌兩次，且在室溫下與RTU抗生蛋白鏈菌素(streptavidin)-辣根過氧化物酶(HRP；Vector Laboratories，目錄號PK-7200)一起培育30分鐘。根據製造商說明書，在室溫下使用3',3'-二胺基聯苯胺(DAB)受質(Vector Laboratories，目錄號PK-4105)進行偵測10分鐘。接著根據製造商說明書，用蘇木精(hematoxylin)(Dako North America, Carpinteria, CA，目錄號K-8008)對組織切片進行複染。使用遞增濃度之乙醇及二甲苯進行連續洗滌來使組織切片脫水且接著用蓋玻片覆蓋。

發現 α FGFR2b抗體之染色濃度0.1至5 mg/ml特別有效用於蛋白質偵測。

如下對染色計分：

0 用 α FGFR2b抗體未觀測到染色

1+ 在用 α FGFR2b抗體染色之樣品中觀測到微弱染色。在用陰性對照抗體染色之相應切片中不存在染色。

2+ 在切片中，為 α FGFR2b抗體所特有之膜-細胞質染色更佔優。

3+ 在至少一子組染色腫瘤細胞中， α FGFR2b抗體在不同膜定位下具有強烈特異性染色。

圖11顯示腫瘤組織之示範性0(A)、1+(B、C)、2+(D)及3+(E、F)染色。在圖11A中，使用 α FGFR2b抗體，乳腺管細胞及分散之腫瘤細胞顯示不存在染色。在顯示間質型胃腫瘤樣品之圖11B中，使用 α FGFR2b抗體，腫瘤細胞(箭號)顯示一定染色，而周圍乳腺管細胞不顯示染色。在顯示彌漫型胃腫瘤樣品之圖11C中，使用 α FGFR2b抗體，腫瘤細胞(箭號)顯示一定染色，而周圍基質細胞(箭頭)不顯示染色。在圖11D中，使用 α FGFR2b抗體，腫瘤細胞(箭號)顯示中度染色，而周圍基質細胞(箭頭)不顯示染色。在圖11E中，使用 α FGFR2b抗體，腫瘤細胞(箭號)顯示高度膜定位染色，而周圍基質細胞(箭頭)不顯示染色。在圖11F中，使用 α FGFR2b抗體，腫瘤細胞(箭號)顯示高度膜/細胞質染色，而周圍基質細胞(箭頭)不顯示染色。

[序列表]

SEQ ID NO	描述	序列		
1	成熟人類 FGFR2IIIb	RPSFSLVED VAAPGESLEV RCLLKDAAVI YLQIKGATPR MVNVTDAISS KRAPYWTNTE AGGNPMPTMR NQHWSLIMES NHTYHLDVVE GGDVEFVCKV YGPDGLPYLK TEADAGEYIC QQAPGREKEI CMVVTVILCR KRIPLRRQVT RLSSTADTPM KLTLGKPLGE EAVTVAVKML MIGKHKNIIN GNLREYLRAR FKDLVSCTYQ RNVLV TENNV TTNGRLPVKW GVLMWEIFTL HRMDKPANCT FKQLVEDLDR SPSYPDTRSS PQYPHINGSV	TTLEPEEPPT SWTKDGVHLG DSGLYACTAS GDDEDDTDGA KMEKRLHAVP WLKNGKEFKQ VVPSDKGNYT RSPHRPILQA YSDAQPHIQW VLKHSGINSS KVSNYIGQAN TASPDYLEIA MKNTTKKPDF VSAESSSSMN LAGVSEYELP GCFGQVMAE KDDATEKDLS LLGACTQDGP RPPGMEYSYD LARGMEYLAS MKIADFGLAR MAPEALFDRV GGSPYPGIPV NELYMMMRDC ILTLTN E EY CSSGDDSVFS	KYQISQPEVY PNNRTVLIGE RTVDSETWYF EDFVSENSNN AANTVKFRCP EHRIGGYKVR CVVENEYGSI GLPANASTVV IKHVEKNGSK NAEVLALFNV QSAWLTVLPK IYCIGVFLIA SSQPAVHKLT SNTPLVRITT EDPKWEFPRD AVGIDKDKPK DLVSEMEMMK LYVIVEYASK INRVPEEQMT QKCIHRDLAA DINNIDYYKK YTHQSDVWSF EELFKLLKEG WHAVPSQRPT LDLSQPLEQY PDPMPYEPCL
2	αFGFR2b 重 鏈; Asn297 用粗 體表示且加下 劃線	QVQLVQSGAE TYNVHWVRQA NQNFKGRATI TAVYYCARGD SVFPLAPSSK VTVSWNSGAL SVVTVPSSSL RVEPKSCDKT PPKPKDTLMI KFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSV MHEALH	VKKPGSSVKV PGQGLEWIGS TADKSTSTAY FAYWGQGTLV STSGGTAALG TSGVHTFPAV GTQTYICNVN HTCPPCPAPE SRTPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYKCKV REPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSKLTVD NHYTQKSLSL	SCKASGYIFT IYPDNGDTSY MELSSLRSED TVSSASTKGP CLVKDYFPEP LQSSGLYSLS HKPSNTKVDK LLGGPSVFLF VDVSHEDPEV EQYNSTYRVV SNKALPAPIE SREEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQQGNVF SPGK
3	αFGFR2b 輕鏈	DIQMTQSPSS NDVAWYQQKP RFSGSGSGTD HSTTPYTFGQ SDEQLKSGTA	LSASVGDRV GKAPKLLIYS FTFTISLQP GTKLEIKRTV SVVCLLNNFY	ITCKASQGV ASYRYTGVP EDIATYYCQ AAPSVFIFPP PREAKVQWKV

		DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT
		LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSN RGE
4	α FGFR2b 重鏈 可變區	QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYIFT
		TYNVHWVRQA	PGQGLEWIGS	IYPDNGDTSY
		NQNFKGRATI	TADKSTSTAY	MELSSLRSED
		TAVYYCARGD	FAYWGQGLV	TVSS
5	α FGFR2b 輕鏈 可變區	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASQGV
		NDVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASYRYTGVPS
		RFSGSGSGTD	FTFTISLQP	EDIATYYCQQ
		HSTTPYTFGQ	GTKLEIK	
6	α FGFR2b 重鏈 (HC) HVR1	TYNVH		
7	α FGFR2b HC HVR2	SIYPDNGDTS YNQNFKG		
8	α FGFR2b HC HVR3	GDFAY		
9	α FGFR2b 輕鏈 (LC) HVR1	KASQGVSNDA		
10	α FGFR2b LC HVR2	SASYRYT		
11	α FGFR2b LC HVR3	QQHSTTPYT		
12	成熟人類 FGFR2IIIc	RPSFSLVED	TTLEPEEPPT	KYQISQPEVY
		VAAPGESLEV		
		RCLLKDAAVI	SWTKDGVHLG	PNNRTVLIGE
		YLQIKGATPR	DSGLYACTAS	RTVDSETWYF
		MVNVTDAISS	GDEDDTDGA	EDFVSENSNN
		KRAPYWTNTE	KMEKRLHAVP	AANTVKFRCP
		AGGNPMPMTMR	WLKNGKEFKQ	EHRIGGYKVR
		NQHWSLIMES	VVPSDKGNYT	CVVENEYGS
		NHTYHLDVVE	RSPHRPILQA	GLPANASTVV
		GGDVEFVCKV	YSDAQPHIQW	IKHVEKNGSK
		YGPDGLPYLK	VLKAAGVNTT	DKEIEVLYIR
		NVTFEDAGEY	TCLAGNSIGI	SFHSAWLTVL
		PAPGREKEIT	ASPDYLEIAI	YCIGVFLIAC
		MVVTVILCRM	KNTTKKPDFS	SQPAVHKLTK
		RIPLRRQVT	SAESSSSMNS	NTPLVRITTR
		LSSTADTPML	AGVSEYELPE	DPKWEFPRDK
		LTLGKPLGEG	CFGQVMAEA	VGIDKDKPKE
		AVTVAVKMLK	DDATEKDLSD	LVSEMEMMKM
		IGKHKNINL	LGACTQDGPL	YVIVEYASKG
		NLREYLRARR	PPGMEYSYDI	NRVPEEQMTF
		KDLVSCTYQL	ARGMEYLASQ	KCIHRDLAAR
		NVLVTENNVM	KIADFGGLARD	INNIDYYKKT
		TNGRLPVKWM	APEALFDRVY	THQSDVWSFG
		VLMWEIFTLG	GSPYPGIPVE	ELFKLLKEGH
		RMDKPANCTN	ELYMMMRDCW	HAVPSQRPTF
		KQLVEDLDRI	LTLTTNEEYL	DLSQPLEQYS
		PSYPDTRSSC	SSGDDSVFSP	DPMPYEPCLP
		QYPHINGSVK	T	

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商戊瑞治療有限公司

<120> 無海藻糖基化抗FGFR2IIIB抗體

<130> FPT-33453/TW-1/ORD

<150> US 61/861, 198

<151> 2013-08-01

<150> US 61/901, 732

<151> 2013-11-08

<150> US 61/933, 632

<151> 2014-01-30

<160> 12

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 801

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu
1 5 10 15

Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val
35 40 45

Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr
50 55 60

Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp
65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr
85 90 95

Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp
100 105 110

Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn
115 120 125

Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg
130 135 140

Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala
145 150 155 160

Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu
165 170 175

Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His
180 185 190

Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr
195 200 205

Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His
210 215 220

Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly
225 230 235 240

Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val
245 250 255

Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His
260 265 270

Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu
275 280 285

Lys Val Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asn Ala Glu Val Leu
290 295 300

Ala Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val
325 330 335

Leu Pro Lys Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser
340 345 350

Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile
355 360 365

Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr Thr
370 375 380

Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr Lys
385 390 395 400

Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser
405 410 415

Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser
420 425 430

Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu
435 440 445

Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly
450 455 460

Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala
465 470 475 480

Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val
485 490 495

Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val
500 505 510

Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile
515 520 525

Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val
530 535 540

Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg

C184031SEQA.doc

Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met Pro
770 775 780

Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val Lys
785 790 795 800

Thr

- <210> 2
- <211> 444
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Asn Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

130	135	140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
145	150	155 160
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
	165 170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
	180 185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
	195 200	205
Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
	210 215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
	225 230	235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
	245 250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
	260 265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
	275 280	285
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	290 295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
	305 310	315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
	325 330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
	340 345	350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100105110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115120125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130135140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145150155160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165170175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180185190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195200205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

151015

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr

202530

Asn Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

354045



Gly Ser Ile Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 6

Thr Tyr Asn Val His
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 7

Ser Ile Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 8

Gly Asp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列



<220>
<223> 合成

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp Val Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 10

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 11

Gln Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 800
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu
1 5 10 15

Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val
35 40 45

Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr
50 55 60

Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp
65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr
85 90 95

Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp
100 105 110

Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn
115 120 125

Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg
130 135 140

Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala
145 150 155 160

Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu
165 170 175

Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His
180 185 190

Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr
195 200 205

Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His
210 215 220

Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly
225 230 235 240

Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val
245 250 255

Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His

260	265	270
Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu		
275	280	285
Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu		
290	295	300
Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr		
305	310	315 320
Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu		
325	330	335
Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro		
340	345	350
Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala		
355	360	365
Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr Thr Lys		
370	375	380
Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr Lys Arg		
385	390	395 400
Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser Ser		
405	410	415
Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser Ser		
420	425	430
Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro		
435	440	445
Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly Lys		
450	455	460
Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Val		
465	470	475 480

Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val Lys
485 490 495

Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser
500 505 510

Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn
515 520 525

Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu
530 535 540

Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro
545 550 555 560

Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu Gln
565 570 575

Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg Gly
580 585 590

Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
595 600 605

Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe
610 615 620

Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr
625 630 635 640

Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp
645 650 655

Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met
660 665 670

Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val
675 680 685

Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro
690 695 700

Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His
705 710 715 720

Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu
725 730 735

Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
740 745 750

Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Arg Ser Ser
755 760 765

Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met Pro Tyr
770 775 780

Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val Lys Thr
785 790 795 800

I633120

發明摘要

※ 申請案號：103126289

※ 申請日：103/07/31

※IPC 分類：A61K; A61P

【發明名稱】

無海藻糖基化抗FGFR2IIIB抗體

AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES

【中文】

本發明提供結合FGFR2IIb之抗體，其中該等抗體為無海藻糖基化抗體。本發明提供包含結合FGFR2IIb之抗體的組合物，其中該組合物中之該等抗體之至少95%為無海藻糖基化抗體。在一些實施例中，提供治療癌症之方法，其包含投與無海藻糖基化抗FGFR2IIb抗體。

【英文】

The present invention provides antibodies that bind FGFR2IIb, wherein the antibodies are afucosylated. The present invention provides compositions comprising antibodies that bind FGFR2IIb, wherein at least 95% of the antibodies in the composition are afucosylated. In some embodiments, methods of treating cancer comprising administering afucosylated anti-FGFR2IIb antibodies are provided.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

申請專利範圍

1. 一種包含複數種抗FGFR2IIIb抗體之組合物的用途，其係用於製備治療有需要之個體之癌症之藥劑，其中該癌症過度表現FGFR2IIIb，其中該等抗FGFR2IIIb抗體包含重鏈及輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：
 - (i) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HVR-H1；
 - (ii) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之HVR-H2；及
 - (iii) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之HVR-H3；且該輕鏈可變區包含：
 - (iv) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9之HVR-L1；
 - (v) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10之HVR-L2；及
 - (vi) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之HVR-L3；且其中該組合物中之該等抗FGFR2IIIb抗體之至少95%為無海藻糖基化抗體。
2. 如請求項1之用途，其中該重鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4。
3. 如請求項1或2之用途，其中該輕鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5。
4. 如請求項1之用途，其中該重鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4且該輕鏈可變域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5。
5. 如請求項1之用途，其中該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2。
6. 如請求項1之用途，其中該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3。
7. 如請求項1之用途，其中該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2且該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3。
8. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該等抗體為單株抗

體。

9. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該等抗體具有至少一種以下性質：
- 該等抗體為嵌合抗體；
 - 該等抗體為人類化抗體；
 - 該等抗體在Asn297處缺乏海藻糖；
 - 該等抗體包含 κ 輕鏈恆定區；
 - 該等抗體包含IgG1重鏈恆定區；
 - 相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，該等抗體具有增強之活體外ADCC活性；
 - 相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體，該等抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力；及
 - 該等抗體結合FGFR2IIIb，但不結合FGFR2IIIc。
10. 如請求項9之用途，其中該等無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之活體外ADCC活性，且其中該等抗體導致特異性溶解比用該海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體達成之特異性溶解大至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少60、至少65、至少70或至少75個百分點。
11. 如請求項9之用途，其中該等抗體相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體具有增強之活體外ADCC活性，且其中使用表現FGFR2IIIb之Ba/F3細胞作為目標細胞以及經分離人類PBMC作為效應細胞測定ADCC活性。
12. 如請求項9之用途，其中該等無海藻糖基化抗體相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體對Fc γ RIIIA具有增強之親和力，且其中該等無海藻糖基化抗FGFR2IIIb抗體結合Fc γ

R111A之親和力比該海藻糖基化抗FGFR2111b抗體大至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少7倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍、至少17倍或至少20倍。

13. 如請求項12之用途，其中使用表面電漿子共振測定對Fc γ R111A之親和力。
14. 如請求項9之用途，其中該等抗體，相較於具有相同胺基酸序列之海藻糖基化抗FGFR2111b抗體，對Fc γ R111A具有增強之親和力，且其中Fc γ R111A係選自Fc γ R111A (V158)及Fc γ R111A (F158)。
15. 如請求項14之用途，其中Fc γ R111A為Fc γ R111A (V158)。
16. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該組合物具有無法偵測到之海藻糖化。
17. 如請求項16之用途，其中藉由包含HPLC、毛細管電泳或MALDI-TOF質譜分析之方法無法偵測到海藻糖。
18. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該組合物包含至少一種醫藥學上可接受之載劑。
19. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該癌症為實體腫瘤。
20. 如請求項19之用途，其中該癌症係選自胃癌、乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌或食道癌。
21. 如請求項20之用途，其中該癌症為胃癌。
22. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中藉由免疫組織化學分析(IHC)測定FGFR2111b之過度表現。
23. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該癌症不包含FGFR2基因擴增。
24. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該癌症包含FGFR2基因擴增。

25. 如請求項1、2及4至7中任一項之用途，其中該組合物進一步包含至少一種選自以下之其他治療劑：鉑藥劑、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、ABRAXANE®、多西他賽(docetaxel)、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱(capecitabine)、伊立替康(irinotecan)、表柔比星(epirubicin)、FOLFOX、FOLFIRI、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、氟尿嘧啶(flourouracil)、絲裂黴素C(mitomycin C)及小紅莓(doxorubicin)鹽酸鹽。
26. 如請求項25之用途，其中該至少一種其他治療劑為鉑藥劑，且其中該鉑藥劑係選自順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)。
27. 如請求項25之用途，其中該其他治療劑為太平洋紫杉醇。
28. 如請求項25之用途，其中該其他治療劑為順鉑及/或5-FU。
29. 如請求項25之用途，其中該其他治療劑為FOLFOX。