



(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 I864207 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：109145973 (22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 24 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)  
C12N15/11 (2006.01) C12N5/10 (2006.01)  
A61P35/00 (2006.01) G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2019/12/24 世界智慧財產權組織 PCT/CN2019/127902

(71)申請人：大陸商迪哲（江蘇）醫藥股份有限公司（中國大陸）DIZAL (JIANGSU)  
PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)  
中國大陸

(72)發明人：王 梅 WANG, MEI (CA)；郭秋莉 GUO, QIULI (CN)；白瑜 BAI, YU (CN)；楊振帆 YANG, ZHENFAN (CN)；張 小林 ZHANG, XIAOLIN (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：  
WO 2018129451A2

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：48 項 圖式數：12 共 106 頁

(54)名稱  
新穎之抗 F G F R 2 b 抗體

(57)摘要

本發明提供抗 FGFR2b 抗體或其抗原結合片段、編碼其的分離的多核苷酸、包含其的藥物組合物及其用途。

The present disclosure provides anti-FGFR2b antibodies or antigen-binding fragments thereof, isolated polynucleotides encoding the same, pharmaceutical compositions comprising the same, and the uses thereof.

指定代表圖：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTTITCSASSGLSYMSWYQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

【圖 1A】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPE  
NRDINYNQKFKGRVTLTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTSRGDYWGQGTTVT  
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTIPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【圖 1B】



I864207

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

新穎之抗 F G F R 2 b 抗體

### 【英文發明名稱】

NOVEL ANTI-FGFR2B ANTIBODIES

### 【中文】

本發明提供抗 FGFR2b 抗體或其抗原結合片段、編碼其的分離的多核苷酸、包含其的藥物組合物及其用途。

### 【英文】

The present disclosure provides anti-FGFR2b antibodies or antigen-binding fragments thereof, isolated polynucleotides encoding the same, pharmaceutical compositions comprising the same, and the uses thereof.

【指定代表圖】第( 1A、1B )圖。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

新穎之抗 F G F R 2 b 抗體

## 【英文發明名稱】

NOVEL ANTI-FGFR2B ANTIBODIES

## 【技術領域】

本申請案大體上涉及新穎之抗FGFR2b抗體。

## 【先前技術】

成纖維細胞生長因子受體(FGFR)是跨膜酪氨酸激酶，由四個結構相關的基因(FGFR1至FGFR4)編碼。這些FGFR的特徵是它們的mRNA經歷多種替代性剪接，從而產生多種同功異型物(Ornitz等人，《生物化學雜誌(J. Biol. Chem.)》271:15292, 1996；關於人FGFR2和其同功異型物的序列，另參見UniProtKB P21802和同功異型物P21802-1至P21802-23；關於人FGFR1和其同功異型物的序列，參見UniProtKB P11362和同功異型物P11362-1至P11362-21)。FGFR具有共同的結構特徵，其由細胞外配體結合區段、跨膜域和細胞內酪氨酸激酶催化域組成，所述細胞外配體結合區段由不同Ig樣域構成( $\alpha$ 同功異型物含有全部三個Ig樣域D1、D2和D3； $\beta$ 同功異型物僅含兩個Ig樣域D2和D3域，但不含D1)。FGF主要通過受體的D2和D3中的區域

結合至受體。在FGFR1-FGFR3中，所有形式都含有D3的第一半，僅含D3的第一半的同功異型物表示為IIIa形式，而兩個替代性外顯子可用於D3的第二半，產生IIIb和IIIc形式。例如，在FGFR-1中，編碼第三個Ig樣域的外顯子經歷替代性剪接產生FGFR1IIIb或FGFR1IIIc(或僅FGFR1b和FGFR1c)剪接形式，其具有不同的配體結合偏好。對於FGFR2，這些形式分別表示為FGFR2IIIb和FGFR2IIIc(或僅FGFR2b和FGFR2c)。FGFR2b僅在上皮來源的細胞中產生，而FGFR2c僅在間充質細胞中產生。FGFR2的FGFR2b形式是對FGF1具有高親和力的受體並且是對KGF家族成員(例如FGF 10、FGF22，尤其是FGF7)具有特異性的受體；而FGFR2c充分結合FGF1和FGF2，但不結合KGF家族成員(Miki等人，《美國國家科學院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》89: 246, 1992)。

FGF在結合至FGFR後介導各種細胞類型中的多種反應，包含增殖、遷移和分化，尤其是在胚胎發育期間(Ornitz等人，《生物化學雜誌》271:15292, 1996)，並且在成體中參與組織動態平衡和修復。已發現KGF(FGF7)和KGFR(FGFR2IIIb)涉及各種類型的癌症，如胰腺癌、胃癌、卵巢癌和乳癌。FGF7和FGFR2b在胰腺癌中過度表達(Ishiwata等人，《美國病理學雜誌(Am. J. Pathol.》153:213, 1998)，並且其共表達與不良預後相關(Cho等人，《美國病理學雜誌》170:1964, 2007)。FGFR2的擴增和過度表達在很大程度上與未分化、擴散類型的胃癌相關聯，

該癌症預後極差，並且小分子化合物抑制FGFR2活性強效地抑制此類癌細胞的增殖(Kunii等人，《癌症研究(Cancer Res.)》68:2340, 2008；Nakamura等人，《胃腸病學(Gastroenterol.)》131:1530, 2006)。FGFR2b配體FGF1、FGF7和FGF10誘導EOC細胞系增殖、活動性以及對細胞死亡的防護作用(Steele等人，《生長因子(Growth Factors)》24:45, 2006)，表明FGFR2b可造成卵巢癌的惡性表型。FGFR2b在約5%的乳癌中高度表達(Finch和Rubin 2006)並通過MAPK和PI3K介導信號級聯(Moffa, Tannheimer等人, 2004)。還發現常見的活化FGFR2突變(例如S252W)與各種癌症相關聯。

FGFR1的擴增或活化在許多癌症中有報導，包含口腔鱗狀細胞癌(Freier等人，《口腔腫瘤(Oral Oncol.)》43(1):60-6, 2007)、乳癌(Turner等人，《癌症研究》1;70(5):2085-94, 2010)、食道鱗狀細胞癌(Ishizuka等人，《生物化學與生物物理學研究通訊(Biochem Biophys Res Commun.)》9;296(1):152-5, 2002)、卵巢癌(Gorringe等人，《臨床癌症研究(Clin Cancer Res.)》15;13(16):4731-9, 2007)、膀胱癌(Simon等人，《癌症研究》1;61(11):4514-9, 2001)、前列腺癌(Edwards等人，《臨床癌症研究》1;9(14):5271-81 2003)以及肺癌，特別是鱗狀亞型(Dutt等人，《公共科學圖書館·綜合(PLoS One.)》6(6):e20351, 2011；Weir等人，《自然(Nature.)》6;450(7171):893-8, 2007；Weiss等人，《科學·轉化醫學(Sci Transl Med.)》

15;2(62):62ra93, 2010)。

迫切需要新穎抗FGFR2b抗體。確切地說，相信尚未報導能夠同時結合至FGFR2b和FGFR1b的抗體。

### 【發明內容】

在本公開通篇，冠詞“一個(種)(a/an)”和“所述”在本文中用於指一個(種)或多個(種)(即，至少一個(種))該冠詞的語法對象。舉例來說，“一種抗體”意味著一種或多種抗體。

本公開提供新穎單克隆抗FGFR2b抗體、其氨基酸和核苷酸序列，以及其用途。

在一方面，本公開提供一種分離的抗FGFR2b抗體，該抗體包含：1、2或3個重鏈互補決定區(CDR)序列，所述重鏈CDR序列選自由SEQ ID NO:1、3、5和7組成的組；和/或1、2或3個輕鏈CDR序列，所述輕鏈CDR序列選自由SEQ ID NO: 2、4和6組成的組，其中所述抗體能夠特異性結合至FGFR2b和FGFR1b。在一些實施例中，本文所提供的抗體與FGFR2c不具有可檢測的結合親和力。

在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：SEQ ID NO:5的重鏈CDR3和/或SEQ ID NO: 6的輕鏈CDR3。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：具有1、2或3個重鏈CDR序列的重鏈可變區(V<sub>H</sub>)，所述重鏈CDR選自由SEQ ID NO:1、3、5和7組成的組，和/或具有1、2或3個輕鏈CDR序列的輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，所述輕鏈CDR選自由SEQ ID

NO:2、4和6組成的組。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：含SEQ ID NO:1、3和5的重鏈可變區(V<sub>H</sub>)，和/或含有SEQ ID NO:2、4和6的輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：含有SEQ ID NO:1、7和5的重鏈可變區(V<sub>H</sub>)，和/或含有SEQ ID NO:2、4和6的輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)。

在一些實施例中，本文所提供的抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO:8、12或16，或其同源序列，所述同源序列與SEQ ID NO:8、12或16具有至少80%序列同一性。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:10或14，或其同源序列，所述同源序列與SEQ ID NO:10或14具有至少80%序列同一性。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：含有SEQ ID NO:8的重鏈可變區和含有SEQ ID NO:10的輕鏈可變區。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：含有SEQ ID NO:12的重鏈可變區和含有SEQ ID NO:14的輕鏈可變區。在一些實施例中，本文所提供的抗體包含：含有SEQ ID NO:16的重鏈可變區和含有SEQ ID NO:10的輕鏈可變區。

在一些實施例中，本文所提供的抗體還包含一個或多個氨基酸殘基取代或修飾，仍然保持與FGFR2b和/或與FGFR1b的特異性結合親和力。在一些實施例中，所述取代或修飾中的至少一個是在所述CDR序列的一個或多個中，和/或在所述V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>序列的一個或多個中，或在所述

V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>序列的一個或多個中，但在所述任何CDR序列的外部。

在一些實施例中，本文所提供的抗體還包含免疫球蛋白恆定區，任選地人免疫球蛋白的恆定區，優選地人IgG的恆定區，更優選地人IgG1的恆定區。

在一些實施例中，本文所提供的抗體在其恆定區內還包含一個或多個修飾，所述修飾：a)引入或移除糖基化位點、b)引入游離半胱氨酸殘基、c)增強與活化Fc受體的結合、和/或d)增強抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)。

在一些實施例中，本文所提供的抗體經歷糖基化工程改造。在一些實施例中，本文所提供的抗體是無岩藻糖基化的。在一些實施例中，本文所提供的無岩藻糖基化抗體在Asn297處缺乏岩藻糖。在一些具體實施例中，經歷糖基化工程改造的抗體相較於其未工程改造的對應物展現增強的ADCC活性。在一些實施例中，所述增強的ADCC是以表達FGFR2b的細胞的裂解提高至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%或75%為特徵。

在一些實施例中，本文所提供的抗體是嵌合抗體。在一些其它實施例中，本文所提供的抗體是人源化抗體。

在一些實施例中，本文所提供的抗體連接至一個或多個綴合物部分。在某些實施例中，所述綴合物部分包含治療劑、放射性同位素、可檢測標記、藥物動力學調節部分

或純化部分。在一些實施例中，所述綴合物部分是直接或通過連接子共價連接。

在另一方面，本公開還提供了分離的抗體或其抗原結合片段，其與以上描述的抗體競爭結合至 FGFR2b 和 / 或 FGFR 1b。

在一方面，本公開提供一種分離的多核苷酸，該分離的多核苷酸編碼本文所提供的抗體。在一些實施例中，所述分離的多核苷酸包含選自下組的核苷酸序列：SEQ ID NO:9、11、13、15或17，以及其同源序列，所述同源序列與SEQ ID NO:9、11、13、15或17具有至少80%序列同一性。在一些實施例中，所述同源序列編碼如SEQ ID NO:9、11、13、15或17編碼的相同的蛋白質。

在另一方面，本公開提供一種表達載體，該表達載體包含本文所提供的分離的多核苷酸。在又另一方面，本公開提供一種宿主細胞，該宿主細胞包含本公開的表達載體。

在又另一方面，本公開提供一種產生本文所提供的抗體的方法。在一些實施例中，所述方法包括在使本公開的表達載體表達的條件下，培養本公開的宿主細胞。在一些實施例中，所述方法還包括純化由所述宿主細胞產生的抗體。

在又另一方面，本公開提供一種藥物組合物，該藥物組合物包括本文所提供的抗體，和藥學上可接受的運載體。

在另一方面，本公開提供一種治療受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況的方法，該方法包括施用治療有效量的本公開的抗體或藥物組合物。

在一些實施例中，所述疾病或病況是癌症，並且任選地，所述癌症以 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的表達或過度表達為特徵。

在一些實施例中，所述施用是經口、鼻、靜脈內、皮下、舌下或肌肉內施用。在一些實施例中，受試者是人。

在另一方面，本公開提供一種檢測樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量的方法，該方法包括使所述樣品與本公開的抗體接觸，以及確定所述樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量。

在另一方面，本公開提供一種診斷受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況的方法，該方法包括：a) 使從所述受試者獲得的樣品與本公開的抗體接觸；b) 確定所述樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量；c) 將所述 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量與所述受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況的存在或狀態相關聯。

在另一方面，本公開提供了對受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況預後的方法，所述方法包括：a) 使從所述受試者獲得的樣品與本公開的抗體接觸；b) 確定所述樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量；c) 將所述 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量與所述受試者對 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 拮抗劑的潛在反應性相關聯。

在另一方面，本公開提供了本公開的抗體在製造用於治療受試者的疾病或病況的藥物中的用途，所述疾病或病況將受益於對FGFR2b和/或FGFR1b表達調節。

在另一方面，本公開提供了本公開的抗體在製造用於檢測FGFR2b和/或FGFR1b相關疾病或病況的診斷試劑中的用途。

在又另一方面，本公開提供了用於檢測FGFR2b和/或FGFR1b的試劑盒，所述試劑盒包含本公開的抗體。

#### 【圖式簡單說明】

[圖 1.]完整 Ab hu21-26(圖中表示為“hu21-26”)輕鏈(A)和重鏈(B)的氨基酸序列，其中CDR加底線底線。

[圖 2.]Ab 21c、Ab hu21-21和afhu21-26(圖中分別表示為“21c”、“hu21-21”和“afhu21-26”)與人FGFR2b或人FGFR1b的Biacore結合 $K_a$ 、 $K_{off}$ 和親和力 $K_D$ ，其中使用FPA144作為對照抗體用於參照比較。

[圖 3.]嵌合 Ab 21c與KATOIII細胞上FGFR2b的劑量依賴性結合的流式細胞術分析。

[圖 4.]Ab 21c與人、食蟹獼猴和大鼠/小鼠FGFR2b的交叉物種結合。

[圖 5.]小鼠 Ab 21(圖中表示為“21”)與人FGFR的各種家族成員的結合選擇性。

[圖 6.]Ab 21c對FGF7誘導的被人FGFR2b穩定轉染的Ba/F3細胞的細胞增殖的抑制作用，其中同種型人IgG1作

為陰性對照。

[圖 7.]Ab 21c劑量依賴性下調FGFR2b磷酸化和其下游靶ERK磷酸化。

[圖 8.]由小鼠Ab 21在與KATOIII細胞一起在37℃下培育2小時和4小時之後細胞內分佈的共聚焦圖像指示的抗體內化情況。小鼠Ab 21在與KATOIII細胞一起在4℃下培育2小時和4小時之後細胞內分佈的共聚焦圖像用作陰性基線對照。

[圖 9.]無岩藻糖基化Ab hu21-26(圖中表示為“afhu21-26”)和岩藻糖基化抗體Ab 21c針對KATOIII細胞的ADCC活性。

[圖 10.]一周兩次腹腔內(i.p.)給與10 mg/kg Ab afhu21-26在SNU16胃癌異種移植模型(A)和LC038患者源性異種移植肺癌模型(B)中的體內抗腫瘤功效。使用FPA144作為比較。

[圖 11.]使用HIC-HPLC進行的未綴合的afhu21-26(底部曲線)和ADC綴合物afhu21-26-MMAE(頂部曲線)的藥物/抗體比分析。

[圖 12.](A) afhu21-26-MMAE在LC038患者源性異種移植肺癌模型中、和(B) Ab 21c-MMAE、Ab 21c-MMAF在SNU16胃癌異種移植模型中的體內抗腫瘤功效。每週向動物靜脈內給藥。

## 【實施方式】

以下對本公開的描述僅旨在說明本公開的各種實施例。因此，所論述的具體改造不應被解釋為對本公開範圍的限制。所屬領域的技術人員將顯而易見的是，可以在不脫離本公開的範圍的情況下實行各種等效、變化和修改，並且應理解，此類等效實施例將包含在本文中。本文引用的所有參考文獻，包含出版物、專利和專利申請，均以全文引用的方式併入本文中。

## 定義

如本文所使用，術語“抗體”包含任何免疫球蛋白、單克隆抗體、多克隆抗體、多價抗體、二價抗體、單價抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體以及其結合至特定抗原的抗原結合片段。天然完整抗體包括兩條重(H)鏈和兩條輕(L)鏈。哺乳動物重鏈分類為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ ，每條重鏈由一個可變區( $V_H$ )以及第一、第二和第三恆定區(分別為 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ )組成；哺乳動物輕鏈分類為 $\lambda$ 或 $\kappa$ ，而每條輕鏈由一個可變區( $V_L$ )和一個恆定區組成。抗體呈“Y”形，並且Y的莖部由通過二硫鍵結合在一起的兩條重鏈的第二和第三恆定區組成。Y的每個臂包含結合至單一輕鏈的可變區和恆定區的單一重鏈的可變區和第一恆定區。輕鏈和重鏈的可變區負責抗原結合。兩條鏈的可變區一般含有三個高變環，稱為互補決定區(CDR)(輕鏈CDR包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，重鏈CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文公開的抗體的CDR邊界可根據

Kabat、IMGT、Chothia或Al-Lazikani的慣例界定或標識 (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., 《分子生物學雜誌 (J. Mol. Biol.)》, 273(4), 927(1997) ; Chothia, C.等人, 《分子生物學雜誌》, 12月5日 ;186(3):651-63(1985) ; Chothia, C.和Lesk, A.M., 《分子生物學雜誌》, 196,901 (1987) ; Chothia, C.等人, 《自然》, 12月21-28日 ;342(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A.等人, 《美國國家衛生研究院(National Institutes of Health)》, 馬里蘭州貝塞斯達(Bethesda, Md.) (1991) ; Marie-Paule Lefranc等人, 《發育與比較免疫學 (Developmental and Comparative Immunology)》, 27: 55-77 (2003) ; Marie-Paule Lefranc等人, 《免疫組研究(Immunome Research)》, 1(3), (2005) ; Marie-Paule Lefranc, 《B細胞分子生物學 (Molecular Biology of B cells)》 (第二版), 第26章, 481-514, (2015))。這三個CDR間雜有稱為構架區(FR)的側接鏈段, FR的保守性要高於CDR的保守性, 並形成了支撐高變環的支架。重鏈和輕鏈的恆定區不參與抗原結合, 但展現出各種效應功能。抗體是根據其重鏈恆定區的氨基酸序列分類。抗體的五個主要類別或同種型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 分別以 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 重鏈的存在為特徵。一些主要抗體類別分為亞類, 如IgG1( $\gamma$ 1重鏈)、IgG2( $\gamma$ 2重鏈)、IgG3( $\gamma$ 3重鏈)、IgG4( $\gamma$ 4重鏈)、IgA1( $\alpha$ 1重鏈)或IgA2( $\alpha$ 2重鏈)。

如本文所使用, 術語“抗原結合片段”是指由完整抗

體的一部分形成的包含一個或多個 CDR 的抗體片段，或其他任何可以結合抗原但不包含完整原生抗體結構的任何其它抗體片段。抗原結合片段的實例包含但不限於雙抗體、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 片段、二硫鍵穩定的 Fv 片段(dsFv)、(dsFv)<sub>2</sub>、雙特異性 dsFv(dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定的雙抗體(ds 雙抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、單鏈 Fv-Fc 抗體(scFv-Fc)、scFv 二聚體(二價雙抗體)、雙特異性抗體、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、納米抗體、域抗體及二價域抗體。抗原結合片段能夠結合至與親本抗體所結合相同的抗原。

與抗體有關的“Fab”是指抗體的由通過二硫鍵結合至單一重鏈的可變區和第一恆定區的單一輕鏈(可變區和恆定區)組成的部分。

“Fab'”是指包含一部分鉸鏈區的 Fab 片段。

“F(ab')<sub>2</sub>”是指 Fab' 的二聚體。與抗體有關的“Fv”是指帶有完整抗原結合位點的抗體的最小片段。Fv 片段由與單一重鏈的可變區結合的單一輕鏈的可變區組成。

“dsFv”是指二硫鍵穩定的 Fv 片段，其中在單一輕鏈的可變區與單一重鏈的可變區之間的鍵聯是二硫鍵。在一些實施例中，“(dsFv)<sub>2</sub>”或“(dsFv-dsFv')”包括三條肽鏈：通過肽連接子(例較長柔性連接子)連接的兩個 V<sub>H</sub> 部分，所述兩個 V<sub>H</sub> 部分並分別通過二硫橋鍵結合至兩個 V<sub>L</sub> 部分的。在一些實施例中，dsFv-dsFv' 具有雙特異性，其中各二硫鍵配對的重鏈和輕鏈具有不同抗原特異性。

“單鏈Fv”或“scFv”是指由輕鏈可變區和重鏈可變區直接或通過肽連接子序列彼此連接組成的工程改造的抗體(Huston JS等人《美國國家科學院院刊》，85: 5879 (1988))。

與抗體有關的“Fc”是指抗體的由通過二硫鍵與第二重鏈的第二和第三恆定區結合的第一重鏈的第二和第三恆定區組成的部分。抗體的Fc部分引起各種效應功能，如抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)和補體依賴性細胞毒性(CDC)，但不在抗原結合中起作用。

“單鏈Fv-Fc抗體”或“scFv-Fc”是指由連接至抗體Fc區的scFv組成的工程改造的抗體。

“駱駝化單域抗體”、“重鏈抗體”或“HCAb”是指含有兩個V<sub>H</sub>域且不含輕鏈的抗體(Riechmann L.和Muyldermans S., 《免疫學方法雜誌(J Immunol Methods.)》 12月10日; 231(1-2): 25-38 (1999); Muyldermans S., 《生物技術雜誌(J Biotechnol.)》 6月; 74(4): 277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 美國專利第6,005,079號)。重鏈抗體最初來源於駱駝科(駱駝、單峰駱駝和羊駝)。儘管不含輕鏈，但駱駝化抗體具有真實(authentic)的抗原結合庫(Hamers-Casterman C.等人, 《自然》 6月3日; 363(6428): 446-8 (1993); Nguyen VK.等人, “駱駝科重鏈抗體：進化創新案例(Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation),” 《免疫遺傳學(Immunogenetics.)》 4月;

54(1): 39-47 (2002) ; Nguyen VK. 等人 , 《 免 疫 學 (Immunology.》 5月 ; 109(1): 93-101 (2003))。重鏈抗體的可變域(“VHH域”)代表由適應性免疫反應產生的已知的最小抗原結合單元(Koch-Nolte F.等人, 《美國實驗生物學學會聯合會雜誌(FASEB J.)》 11月 ; 21(13): 3490-8. Epub 2007年6月15日(2007))。

“納米抗體”是指由來自常規IgG的重鏈抗體的一個VH域以及兩個重鏈恆定域, 例如CH2和CH3組成的抗體片段。

“雙抗體”或“dAb”包含具有兩個抗原結合位點的小抗體片段, 其中所述片段包括連接至同一多肽鏈中的V<sub>L</sub>域的V<sub>H</sub>域(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>)(參見例如HolligerP.等人, 《美國國家科學院院刊》7月15日 ; 90(14): 6444-8(1993) ; EP404097 ; WO93/11161)。通過使用過短而使得同一鏈上的兩個域之間不能配對的连接子, 迫使域與另一條鏈的互補域配對, 由此產生兩個抗原結合位點。所述抗原結合位點可靶向相同或不同的抗原(或表位)。在某些實施例中, “雙特異性二硫鍵穩定的雙抗體”是靶向兩個不同抗原(或表位)的雙抗體。

在某些實施例中, “scFv二聚體”是一種二價雙抗體或二價ScFv(BsFv), 其包含V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>(通過肽連接子連接)與另一個V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>部分二聚化, 使得一個部分的V<sub>H</sub>與另一個部分的V<sub>L</sub>配位並形成可靶向相同抗原(或表位)或不同抗原(或表位)的兩個結合位點。在其它實施例中, “scFv二聚

體”是一種雙特異性雙抗體，其包含 $V_{H1}$ - $V_{L2}$ (通過肽連接子連接)與 $V_{L1}$ - $V_{H2}$ (也通過肽連接子連接)締合，使得 $V_{H1}$ 與 $V_{L1}$ 配位且 $V_{H2}$ 與 $V_{L2}$ 配位並且每個配位對具有不同抗原特異性。

“域抗體”是指僅含重鏈可變區或輕鏈可變區的抗體片段。在某些情況下，兩個或更多個 $V_H$ 域用肽連接子共價接合，產生二價或多價域抗體。二價域抗體的兩個 $V_H$ 域可靶向相同或不同的抗原。

如本文所使用，術語“嵌合”意思指重鏈和/或輕鏈的一部分來源於一個物種且其餘重鏈和/或輕鏈來源於不同物種的抗體或抗原結合片段。在一個示意性實例中，嵌合抗體可包括來源於人類的恆定區和來源於如小鼠之類非人類動物的可變區。在一些實施例中，非人類動物是哺乳動物，例如小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊、豚鼠或倉鼠。

如本文所使用，術語“人源化”意思指抗體或抗原結合片段包括來源於非人類動物的CDR、來源於人類的FR區，並且在適用時，恆定區是來源於人類。

如本文所使用，術語“二價”是指具有兩個抗原結合位點的抗體或抗原結合片段；術語“單價”是指僅具有單一抗原結合位點的抗體或抗原結合片段；並且術語“多價”是指具有多個抗原結合位點的抗體或抗原結合片段。

如本文所使用，“雙特異性”抗體是指具有來源於兩種不同單克隆抗體並且能夠結合至兩個不同表位的人工抗體或抗原結合片段。兩個表位可存在於同一抗原上，或其

可存在於兩種不同抗原上。

除非另外說明，否則如本文所使用，術語“FGFR”涵蓋任何和所有成纖維細胞生長因子受體家族成員(FGFR1-FGFR4)，並且意圖涵蓋任何形式的FGFR，例如1)原生未加工的FGFR分子、“全長”FGFR鏈或FGFR的天然存在的變體，包含例如等位基因變體；2)由在細胞中加工產生的任何形式的FGFR，例如不同剪接形式，例如FGFR1b、FGFR1c、FGFR2a、FGFR2b、FGFR2c等；或3)通過重組方法產生的FGFR亞基的片段(例如截短形式、細胞外/跨膜域)或修飾的形式(例如突變形式、糖基化/聚乙二醇化、His標記/免疫螢光融合形式)。如本文所使用，“FGFR”可來源於任何脊椎動物來源，包含哺乳動物，如靈長類動物(例如人類、猴)和齧齒動物(例如小鼠和大鼠)。

術語“FGFR2IIIb”和“FGFR2b”可互換使用，意思指FGFR2的亞型IIIb剪接形式。例示性FGFR2b序列包含智人(人類)FGFR2b蛋白質(例如帶信號肽的前體序列，Genbank獲取編號：NP\_075259.4)；褐家鼠(*Rattus norvegicus*)(大鼠)FGFR2b蛋白質(例如全序列，Genbank獲取編號：NP\_001103363.1)；小家鼠(*Mus musculus*)(小鼠)FGFR2b蛋白質(例如全序列，Genbank獲取編號：NP\_963895.2)。

“FGFR2IIIc”或“FGFR2c”可互換使用，意思指FGFR2的亞型IIIc剪接形式。例示性FGFR2c序列包含人

FGFR2c 蛋白質 (例如前體序列，Genbank 獲取編號：NP\_000132.3)；褐家鼠(大鼠)FGFR2c 蛋白質(全序列，Genbank 獲取編號：NP\_001103362.1)；小家鼠(小鼠)FGFR2c 蛋白質(全序列，Genbank 獲取編號：NP\_034337.2)。

術語“FGFR1IIIb”和“FGFR1b”可互換使用，意思指FGFR1的亞型IIIb剪接形式。例示性FGFR1b序列包含智人(人類)FGFR1b蛋白質(例如帶信號肽的前體序列，UniProtKB獲取編號：P11362-19)；小家鼠(小鼠)FGFR1b蛋白質(例如帶信號肽的前體序列，UniProtKB獲取編號：P16092-5)。

術語“抗FGFR2b抗體”是指能夠特異性結合至FGFR2b的抗體。在一些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體能夠特異性結合至FGFR2b和FGFR1b兩者，但不結合至FGFR2c和FGFR1c，或與FGFR2c和FGFR1c的結合不太強(例如與FGFR2c或FGFR1c的結合親和力比與FGFR2b或FGFR1b的結合親和力要低至少10倍、或要低至少50倍、或要低至少100倍、或要低至少200倍)。在一些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體與FGFR2c不具有可檢測的結合親和力。

如本文所使用，術語“特異性結合(specific binding/specifically binds)”是指兩個分子之間，如抗體與抗原之間的非隨機結合反應。本文所提供的抗體和抗原結合片段的結合親和力可由 $K_D$ 值表示， $K_D$ 表示當抗原和

抗原結合分子(例如抗體和抗原結合片段)之間的結合達到平衡時解離速率與締合速率的比率( $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ )。抗原結合親和力(例如 $K_D$ )可使用本領域中已知的適合方法，包含例如Biacore技術(該技術是基於表面等離子體共振技術，參見例如Murphy,M.等人，《最新蛋白質科學實驗指南(Current protocols in protein science)》，第19章，第19.14單元，2006)、Kinexa技術(參見例如Darling,R.J.等人，《測定與藥物開發技術(Assay Drug Dev.Technol.)》，2(6):647-657(2004))和流式細胞術適當地確定。

如本文所使用，“競爭結合”能力是指抗體或抗原結合片段抑制兩個分子(例如人FGFR2b和抗FGFR2b抗體)之間的結合相互作用達到任何可檢測程度(例如抑制至少85%、或至少90%、或至少95%)的能力。本領域的普通技術人員應認識到，無需過度實驗即可確定給定抗體是否與本公開的抗體(例如Ab 21、Ab 21c、Ab hu21-21或Ab hu21-26，如下文所定義)競爭結合至FGFR 2b和/或FGFR1b。

如本文所使用，術語“表位”是指在抗體所結合的抗原上的原子或氨基酸的特定的組。

與氨基酸序列有關的“保守取代”是指氨基酸殘基被含有具有類似物理化學特性的側鏈的不同氨基酸殘基置換。例如，可在具有疏水性側鏈的氨基酸殘基(例如Met、Ala、Val、Leu和Ile)間、具有中性親水性側鏈的殘基(例如Cys、Ser、Thr、Asn和Gln)間、具有酸性側鏈的殘基(例如Asp、Glu)間、具有鹼性側鏈的氨基酸(例如His、Lys和

Arg)間、或具有芳香族側鏈的殘基(例如 Trp、Tyr和Phe)間進行保守取代。如本領域中所知，保守取代通常不會引起蛋白質構形結構的顯著變化，並因此可保持蛋白質的生物活性。

如本文所使用，術語“同源物”和“同源”是可互換的並且是指當最佳地對準時與另一序列具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的核酸序列(或其互補鏈)或氨基酸序列。

與氨基酸序列(或核酸序列)有關的“序列同一性百分比(%)”定義為在對準候選序列與參照序列並在必要時，引入空位以使一致氨基酸(或核酸)達到最大數量之後，該候選序列中與該參照序列中的氨基酸(或核酸)殘基一致的氨基酸(或核酸)殘基的百分比。氨基酸殘基的保守取代可視為或可不視為一致殘基。出於確定氨基酸(或核酸)序列同一性百分比的目的進行的比對可例如使用可公開獲得的工具，如BLASTN、BLASTp(可見於美國國家生物資訊技術資訊中心(U.S.National Center for Biotechnology Information, NCBI)的網站，另參見Altschul S.F.等人，《分子生物學雜誌(J. Mol. Biol.)》，215:403-410(1990)；Stephen F.等人，《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》，25:3389-3402(1997))、ClustalW2(可見於歐洲生物資訊研究所(European Bioinformatics Institute)網站，另參見Higgins D.G.等人，《酶學方法(Methods in

Enzymology)》，266:383-402(1996)；Larkin M.A。等人，  
《生物資訊學(Bioinformatics)》(英格蘭牛津(Oxford, England)), 23(21):2947-8(2007))) 和 ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)軟體實現。本領域的普通技術人員可使用所述工具提供的默認參數，或可定制適於比對的參數，如通過選擇適合演算法進行。

“分離的”物質已通過人工方式自天然狀態改變。如果“分離的”組合物或物質存在於自然界中，則該組合物或物質已經從其原始環境改變或從其原始環境移出，或這兩種情況都有。例如，天然地存在於活動物體內的多核苷酸或多肽不是“分離”的，但如果該多核苷酸或多肽與其天然狀態的共存材料充分地分離，由此以大體上純的狀態存在，則該多核苷酸或多肽是“分離的”。“分離的多核苷酸序列”是指分離的多核苷酸分子的序列。在某些實施例中，“分離的抗體”是指具有至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的純度的抗體，所述純度是通過電泳法(如SDS-PAGE、等電聚焦、毛細電泳法)或色譜法(如離子交換色譜或反相HPLC)確定。

如本文所使用，“效應功能”是指由抗體Fc區與其效應物，如C1複合物與Fc受體結合引起的生物活性。例示性效應功能包含：由抗體與C1複合物上的C1q的相互作用誘導的補體依賴性細胞毒性(CDC)；由抗體Fc區與效應細胞

上的Fc受體結合所誘導的抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)；以及吞噬作用。

“抗體依賴性細胞介導的細胞毒性”和“ADCC”是指一種細胞介導的反應，在該反應中，表達Fc受體(FcR)的效應細胞識別結合於靶細胞上的抗體或抗原結合片段且隨後引起靶細胞溶解。“ADCC活性”是指如上文所描述，結合於靶細胞上的抗體或抗原結合片段引起ADCC反應的能力。

“靶細胞”是包含Fc區的抗體所特異性結合的細胞，該結合一般通過在Fc區C末端的蛋白質部分實現。“效應細胞”是表達一種或多種Fc受體並執行效應功能的白細胞。優選地，所述細胞至少表達Fc $\gamma$ RIII並執行ADCC效應功能。介導ADCC的人白細胞的實例包括外周血單核細胞(PBMC)、自然殺傷(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞以及嗜中性粒細胞；其中優選PBMC和NK細胞。效應細胞可從其原生來源，例如，如本領域中所知從血液或PBMC分離。

如本文所使用，“載體”是指當引入適當細胞宿主中時能夠複製/克隆其中所包含的所需核酸片段，或能夠表達由此類所需核酸片段所編碼的蛋白質的多核苷酸分子。載體的實例包含克隆載體和表達載體兩種。如本文所使用，術語“表達載體”是指編碼蛋白質的多核苷酸可以被可操作地插入以引起該蛋白質表達的媒介物。表達載體可以含有多種用於控制表達的元件，包含啟動子序列、轉錄

起始序列、增強子序列、選擇性元件和報導基因。此外，所述載體可以含有複製起點。

如本文所使用，短語“宿主細胞”是指引入了外源多核苷酸和/或表達載體的細胞。

如本文所使用，病況的“治療(treating/treatment)”包含預防或減輕病況、減緩病況的發作或發展速率、降低發展病況的風險、預防或延遲與病況有關的症狀的發展、減少或消除與病況有關的症狀、產生病況的完全或部分消退、治癒病況或其某種組合。

如本文所使用，“FGFR 2b和/或FGFR 1b相關”疾病或病況是指易於用FGFR2b調節劑和/或FGFR1b調節劑治療，或與FGFR2b和/或FGFR1b表達或過度表達相關的任何疾病或病況。在一些實施例中，FGFR 2b和/或FGFR 1b相關疾病或病況是癌症，以及任選地FGFR2b和/或FGFR1b表達呈陽性或表達增加的癌症。

如本文所使用，“癌症”是指以惡性細胞生長或贅瘤、異常增殖、浸潤或轉移為特徵的任何醫學病況，並且包含實體腫瘤和非實體癌兩種。如本文所使用，“實體腫瘤”是指贅生性和/或惡性細胞的固體塊。“非實體癌”是指惡性血液病，如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和其它惡性血液病。癌症或腫瘤的實例包含惡性血液病(例如淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤和B細胞淋巴瘤)、口腔癌(例如唇、舌或咽的癌瘤)、消化器官(例如食道、胃、小腸、結腸、大腸或直腸)、腹

膜、肝臟和膽道、胰腺、呼吸系統如喉或肺(小細胞和非小細胞)、骨、結締組織、皮膚(例如黑素瘤)、乳房、生殖器官(輸卵管、子宮、子宮頸、睪丸、卵巢或前列腺)、泌尿道(例如膀胱或腎)、腦和內分泌腺如甲狀腺的腫瘤。在某些實施例中，癌症選自卵巢癌、子宮內膜癌、乳癌、肺癌(小細胞或非小細胞肺癌)、膀胱癌、結腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌(肝癌)、腎細胞癌(腎癌)、頭頸癌、間皮瘤、黑素瘤、肉瘤和腦腫瘤(例如神經膠質瘤，如膠質母細胞瘤)。

術語“藥學上可接受的”指示，指定載體、媒劑、稀釋劑、賦形劑和/或鹽一般在化學上和/或物理上與構成配製物的其它成分相容，並且在生理上與其接受者相容。

### 抗 FGFR2b 抗體

本公開提供了包括 Ab 21 的一個或多個(例如 1、2、3、4、5 或 6 個)CDR 序列的抗 FGFR2b 抗體。表 1 顯示 Ab 21 的 CDR 序列。如本文所使用，術語“Ab 21”是指具有 SEQ ID NO:12 的重鏈可變區和 SEQ ID NO:14 的輕鏈可變區的小鼠單克隆抗體。Ab 21 特異性結合至 FGFR2b 和 FGFR1b 兩者。

表 1. Ab 21的 CDR氨基酸序列

|       |                       |                       |                       |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ab 21 | HCDR1<br>SEQ ID NO: 1 | HCDR2<br>SEQ ID NO: 3 | HCDR3<br>SEQ ID NO: 5 |
|       | NYWMH                 | AIYPENGDINYNQKFKG     | RGDY                  |
|       | LCDR1<br>SEQ ID NO: 2 | LCDR2<br>SEQ ID NO: 4 | LCDR3<br>SEQ ID NO: 6 |
|       | SASSGLSYMS            | DTSNLAS               | QQWSSYPYT             |

已知 CDR引起抗原結合，但已發現，並非全部 6個 CDR都是必不可少的或不可改變的。換句話說，可更換或改變或修飾 Ab 21中的一個或多個 CDR，但大體上保持與 FGFR，特別是 FGFR2b和 FGFR1b的特異性結合親和力。

在某些實施例中，本文所提供的抗 FGFR2b抗體可在表 1中所提供的一個或多個 CDR區中包括一個或多個修飾或取代。此類變體保持其親本抗體與 FGFR2b和 /或 FGFR1b的特異性結合親和力，但其特性可具有一種或多種改良，如較高抗原結合親和力或降低的糖基化可能性。

在某些實施例中，本文所提供的抗 FGFR2b抗體可被修飾成移除 CDR區內(或可變區內)的一個或多個 Asn或 Asp熱點。此類 Asn和 Asp熱點可導致抗體降解並因此降低抗體的穩定性。CDR區內的例示性推定的熱點基元(motif)包含 Asn-Gly、Asn-Thr、Asn-Ser、Asn-Asn、Asp-Gly、Asp-Thr、Asp-Ser、Asp-Asp以及 Asp-His。在某些實施例中，Ab 21的 HCDR2被修飾成移除 Asn-Gly(NG)熱點。在某些實施例中，修飾的 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 7 (AIYPENRDINYNQKFKG)。

在一些實施例中，本文所提供的抗 FGFR2b抗體包含 SEQ ID NO:5的重鏈 CDR3序列，和任選地 SEQ ID NO: 6的

輕鏈 CDR3。重鏈 CDR3 區位於抗原結合位點的中心，並因此認為該區域最易與抗原接觸並向抗體對抗原的親和力提供最大自由能。另外，根據多種多樣化機制 (multiple diversification mechanisms)，相信就長度、氨基酸組成和構形來說，重鏈 CDR3 是迄今為止抗原結合位點最多樣化的 CDR (Tonegawa S., 《自然》 302:575-81.(1983))。重鏈 CDR3 的多樣性足以產生大部分抗體特異性 (Xu JL, Davis MM. 《免疫》 13:37-45 (2000)) 以及所需的抗原結合親和力 (Schier R 等 《分子生物學雜誌》 263:551-67(1996))。

在某些實施例中，本文所提供的抗 FGFR2b 抗體還包括適合構架區 (FR) 序列，只要所述抗體能特異性結合至 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b。表 1 中所提供的 CDR 序列是從小鼠抗體獲得，但這些序列可使用本領域中已知的適合方法，如重組技術移植至任何適合物種，如小鼠、人類、大鼠、兔等的任何適合 FR 序列上。

在某些實施例中，本文所提供的抗 FGFR2b 抗體是人源化的。本文所提供的例示性人源化抗體包含 Ab Hu21-21 和 Ab hu21-26。

如本文所使用，“Ab hu21-21”是指基於 Ab 21 的人源化抗體，該抗體具有 SEQ ID NO: 16 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 10 的輕鏈可變區。

如本文所使用，“Ab hu21-26”是指基於 Ab 21 的人源化抗體，該抗體具有 SEQ ID NO: 8 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 10 的輕鏈可變區。Ab hu21-26 的重鏈可變區序列 (SEQ

ID NO: 8)除存在G56R突變外，在其它方面與Ab hu21-21的重鏈可變區序列(SEQ ID NO: 16)一致，該突變移除了HCDR2中的NG熱點。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體還包括免疫球蛋白恆定區，任選地人免疫球蛋白，任選地人IgG。在一些實施例中，免疫球蛋白恆定區包含重鏈和/或輕鏈恆定區。重鏈恆定區包括CH1、鉸鏈和/或CH2-CH3區。在某些實施例中，重鏈恆定區包含Fc區。在某些實施例中，輕鏈恆定區包含Cκ或Cλ。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體是包含小鼠可變區和人恆定區的嵌合抗體。如本文所使用，“Ab 21c”是指基於Ab 21的嵌合抗體，該抗體包括分別與人重鏈恆定區和人輕鏈恆定區融合的SEQ ID NO:12的小鼠重鏈可變區和SEQ ID NO:14的小鼠輕鏈可變區。

表2和表3顯示例示性抗體的可變區序列。

表 2. 例示性抗體的可變區的氨基酸序列

|               |                                                                                                                             |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ab<br>hu21-26 | V <sub>H</sub> (SEQ ID NO:8)                                                                                                |
|               | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQ<br>GLEWMGAIYPENRDINYNQKFKGRVTLTRDTSISTAYMELSRLRS<br>DDTAVYYCTSRGDYWGQGTTVTVSS   |
|               | V <sub>L</sub> (SEQ ID NO:10)                                                                                               |
|               | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGLSYMSWYQQKPGKAPKLL<br>IYDTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSS<br>YPYTFGQGGTKLEIK         |
|               |                                                                                                                             |
| Ab 21c        | V <sub>H</sub> (SEQ ID NO:12)                                                                                               |
|               | EVQLHQSGTVLARPGASVKMSCKTSGYTFTNYWMHWIKQRPQG<br>GLEWIGAIYPENG DINYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYMDLSSLTN<br>EDSAVYYCTSRGDYWGQGTTTLTVSS |
|               | V <sub>L</sub> (SEQ ID NO:14)                                                                                               |
|               | QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSGLSYMSWYQQKPGSSPRL<br>LIYDTSNLA SGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQW<br>SSYPYTFGGGGTKLEIK        |
|               |                                                                                                                             |
| Ab<br>hu21-21 | V <sub>H</sub> (SEQ ID NO:16)                                                                                               |
|               | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQ<br>GLEWMGAIYPENG DINYNQKFKGRVTLTRDTSISTAYMELSRLRS<br>DDTAVYYCTSRGDYWGQGTTVTVSS  |
|               | V <sub>L</sub> (SEQ ID NO: 10)                                                                                              |
|               | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGLSYMSWYQQKPGKAPKLL<br>IYDTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSS<br>YPYTFGQGGTKLEIK         |
|               |                                                                                                                             |

表 3. 例示性抗體的可變區的核苷酸序列

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ab<br>hu21-26 | V <sub>H</sub> : 核苷酸序列 (SEQ ID NO:9)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|               | GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCC<br>GGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCT<br>TCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCCA<br>GGGCCTGGAGTGGATGGGCGCCATCTACCCCGAGAACAGGGAC<br>ATCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTGACCCTGACCA<br>GGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCT<br>GAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGCAGGGGC<br>GACTACTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGC |
|               | V <sub>L</sub> : 核苷酸序列 (SEQ ID NO:11)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|               | GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCG<br>TGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCGGCCT<br>GAGCTACATGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC<br>AAGCTGCTGATCTACGACACCAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGC<br>CCAGCAGGTTCA GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT<br>GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTAC<br>TGCCAGCAGTGGAGCAGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCA<br>CCAAGCTGGAGATCAAG                     |
|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ab 21c     | V <sub>H</sub> : 核苷酸序列 (SEQ ID NO:13)<br>GAGGTTTCAGCTCCACCAAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTG<br>GGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTTCTGGCTACACATTT<br>ACCAACTACTGGATGCACTGGATAAAACAGAGGCCTGGACAGG<br>GTCTGGAATGGATAGGGGCTATTTATCCTGAAAATGGTGATAT<br>TAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCA<br>GTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGA<br>CAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGTCGGGGGGA<br>CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA |
|            | V <sub>L</sub> : 核苷酸序列 (SEQ ID NO:15)<br>CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC<br>AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAGGTTTA<br>AGTTACATGTCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCA<br>GACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT<br>GTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC<br>AATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC<br>CAGCAGTGGAGTAGTTACCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCA<br>AGCTGGAAATAAAA                      |
| Ab hu21-21 | V <sub>H</sub> : 核苷酸序列 (SEQ ID NO:17)<br>GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCC<br>GGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCT<br>TCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCCA<br>GGGCCTGGAGTGGATGGGCGCCATCTACCCCGAGAACGGCGAC<br>ATCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTGACCCTGACCA<br>GGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCT<br>GAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGCAGGGGC<br>GACTACTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGC  |
|            | V <sub>L</sub> : 核苷酸序列 (SEQ ID NO:11)<br>GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCG<br>TGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCGGCCT<br>GAGCTACATGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC<br>AAGCTGCTGATCTACGACACCAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGC<br>CCAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT<br>GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTAC<br>TGCCAGCAGTGGAGCAGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCA<br>CCAAGCTGGAGATCAAG                       |

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體可在本文所提供的一個或多個可變區序列中含有一個或多個修飾或取代，仍保持與FGFR2b和/或FGFR 1b的特異性結合親和力。在某些實施例中，CDR序列、FR序列或可變區序列中的取代中的至少一個(或全部)包括保守取代。

本領域中已知的各種方法均可用于達成此目的。例

如，可使用噬菌體展示技術產生並表達抗體變體(如Fab或scFv變體)的文庫，接著，針對與人FGFR2b和/或FGFR1b的結合親和力進行篩選。又，例如可使用電腦軟體軟體虛擬地模擬抗體與FGFR2b和/或FGFR1b的結合，並鑒別抗體上形成結合界面的氨基酸殘基。此類殘基可避免進行取代，以便防止結合親和力的降低，或作為取代的目標以實現較強結合。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體在SEQ ID NO:1-7內的一個或多個CDR序列、和/或一個或多個FR序列中包含一個或多個氨基酸殘基取代。在某些實施例中，CDR序列和/或FR序列中總計進行不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個取代。

在某些實施例中，抗FGFR2b抗體包含與SEQ ID NO:1-7中所列的CDR序列具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的1、2、3、4、5或6個CDR序列，並且同時保持與其親本抗體類似或甚至更高水準的與FGFR2b和/或FGFR1b的結合親和力。

在某些實施例中，抗FGFR2b抗體包含與表2中所列的可變區序列具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的一個或多個可變區序列，並且同時保持與其親本抗體類似或甚至更高水準的與FGFR2b和/或FGFR1b的結合親和力。在一些實施例中，表2中所列的可變區序列

中總計有1至10個氨基酸被取代、插入或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生於CDR外部的區域中(例如FR中)。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體包含能夠誘導效應功能，如ADCC或CDC的恆定區。效應功能，如ADCC和CDC可引起對表達FGFR的細胞的細胞毒性，並且可使用各種測定法，如Fc受體結合測定法、C1q結合測定法和細胞裂解測定法評價。在某些實施例中，恆定區屬於IgG1同種型，已知其誘導ADCC。

在某些實施例中，抗FGFR2b抗體在恆定區中包括使ADCC增強的一個或多個修飾。如本文所使用，術語“增強的ADCC”定義為在包圍靶細胞的培養基中給定濃度的抗體存在下，由以上所定義的ADCC機制引起的在給定時間中裂解的靶細胞的數量增加，和/或在包圍靶細胞的培養基中，由ADCC機制引起的給定時間中給定數量靶細胞裂解所需的抗體濃度減小。

為了評估所關注分子的ADCC活性，可執行體外ADCC測定法，如美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人《美國國家科學院院刊》83, 7059-7063(1986)；和Hellstrom等人，《美國國家科學院院刊》82, 1499-1502(1985)；美國專利第5,821,337號；或Bruggemann等人，《實驗醫學雜誌(J Exp Med)》166, 1351-1361(1987)中所述的ADCC測定法。或者，可採用非放射性測定法(參見例如用於流式細胞術的ACTI™非放射性細胞毒性測定法

(加利福尼亞州山景城 (Mountain View, CA) 的 Cell Technology Inc.)；以及 CytoTox 96<sup>®</sup> 非放射性細胞毒性測定法 (威斯康辛州麥迪森 (Madison, WI) 的 Promega))。另外，所關注分子的 ADCC 活性可以在體內，例如在如 Clynes 等人，《美國國家科學院院刊》，95:652-656 (1998) 中所公開的動物模型中評估。

增強 ADCC 的各種方法在現有技術中已有描述。例如，已證明 Fc 區中的氨基酸殘基的子集涉及與 Fc $\gamma$ R 的結合，如 Fc 區中的以下氨基酸殘基 (殘基按 EU 編號) 涉及與人 Fc $\gamma$ RIIIA 的結合：(1) Lys274-Arg301 和 Tyr407-Arg416 (Sarmay 等人 (1984) 《分子免疫學 (Mol. Immunol.)》，21:43-51 和 Gergely 等人 (1984) 《生物化學學會學報 (Biochem. Soc. Trans.)》，12:739-743)；(2) Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299 和 Ala327-Ile332 (Sondermann 等人 (2000) 《自然》，406:267-273)；和 (3) T256、K290、S298、E333、K334、A339 (Shields 等人 (2001) 《生物化學雜誌》，276:6591-6604；以及美國專利申請第 2004/0228856 號)。以上所列的氨基酸殘基可突變以增強 ADCC 活性，例如在 Shields 等人 (2001)，《生物化學雜誌》9(2)，6591-6604 中，經證實，相較于原生序列，Fc 變體 T256A、K290A、S298A、E333A、K334A 和 A339T 可增強 ADCC 活性。

或者，可通過對抗體的糖基化形式進行工程改造，獲得增強的 ADCC 活性。據報導，多種糖基化形式可通過增

強其與效應細胞的Fc受體的結合來增強抗體的ADCC活性。不同糖基化形式包含連接至抗體的聚糖的若干形式中的任何，具有不同糖(例如缺乏一種類型的糖，如岩藻糖，或具有較高水準的一種類型的糖，如甘露糖)，或具有不同結構(例如各種分支結構，如雙觸角(兩個分支)、三觸角(三個分支)或四觸角(四個分支)結構)。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體經歷糖基工程改造。“糖基工程改造的”抗體或抗原結合片段可具有相較於其未經歷糖基工程改造的對應物增加或降低的糖基化水平、糖基化形式變化或兩者。在某些實施例中，糖基工程改造的抗體展現相較於其未經歷工程改造的對應物增強的ADCC活性。在一些實施例中，增強的ADCC活性以表達FGFR2b的細胞的裂解提高至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%或75%為特徵。

所述抗體可通過本領域中已知的方法進行糖基工程改造，包含針對肽主鏈的任何操作(例如修飾氨基酸序列和/或個體氨基酸的側鏈基團)和/或通過宿主細胞系對翻譯後修飾的操作(例如修飾糖基化模式)。通過對抗體進行糖基化工程改造來改變ADCC活性的方法在本領域中也已有描述，參見例如Weikert等人(1999)《自然-生物技術(Nature Biotech.)》，17:116-121；Shields R. L.等人(2002)，《生物化學雜誌》，277: 26733-26740；Shinkawa等人(2003)，《生物化學雜誌》，278, 3466-3473；Ferrara等人(2006)，

《生物技術與生物工程(Biotech. Bioeng.)》, 93, 851-861 ; Yamane-Ohnuki等人(2004), 《生物技術與生物工程》, 87, 614-622 ; Niwa等人(2006), 《免疫學方法雜誌》 306, 151-160 ; Shinkawa T.等人, 《生物化學雜誌》, (2003), 278: 3466-3473。

在一些實施例中, 本文所提供的糖基工程改造的抗體是無岩藻糖基化的(即, 不含岩藻糖)。若干研究顯示, 無岩藻糖基化(即, 缺乏岩藻糖或未岩藻糖基化)的抗體展現與FcγRIII的結合增加並因此引起較高的ADCC活性(Shields等人(2002)《生物化學雜誌》, 277:26733-26740 ; Shinkawa等人(2003)《生物化學雜誌》, 278:3466-3473 ; 以及歐洲專利申請公開第1176195號)。在一些實施例中, 本文所提供的無岩藻糖基化抗體在重鏈的天冬醯胺297(Asn297)(基於Kabat編號)處沒有岩藻糖。Asn297是在抗體IgG1同種型的Fc區的每個CH<sub>2</sub>域中存在的保守N-連接糖基化位點(Arnold等人, 《糖生物學與醫學(Glycobiology and Medicine)》, 564:27-43, 2005)。

在一些實施例中, 本文所提供的糖基工程改造的抗體以高甘露糖糖基化形式(例如甘露糖e5、甘露糖7、8、9聚糖)為特徵。經證實, 高甘露糖糖基化形式可增強ADCC活性(Yu等人(2012), 蘭德斯生物醫學(Landes Bioscience), mAbs 4:4, 475-487)。

在一些實施例中, 本文所提供的抗體在其恆定區內還包括一個或多個修飾, 所述修飾: a)引入或移除糖基化位

點、b)引入游離半胱氨酸殘基、c)增強與活化Fc受體的結合、和/或d)增強ADCC。

抗FGFR2b抗體或其抗原結合片段可包含具有可連接碳水化合物部分(例如寡糖結構)的側鏈的一個或多個氨基酸殘基。抗體的糖基化典型地是N-連接或O-連接的。N-連接是指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基，例如三肽序列如天冬醯胺-X-絲氨酸和天冬醯胺-X-蘇氨酸中的天冬醯胺殘基的側鏈連接，其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸。O-連接糖基化是指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一種與羥基氨基酸，最常見地與絲氨酸或蘇氨酸的連接。天然糖基化位點的移除可便利地實現，例如通過改變氨基酸序列以使得抗體序列中存在的上述三肽序列(對於N-連接糖基化位點)中的一個或絲氨酸或蘇氨酸殘基(對於O-連接糖基化位點)被取代來實現。可按類似方式，通過引入此類三肽序列或者絲氨酸或蘇氨酸殘基來產生新的糖基化位點。

本文所提供的抗FGFR2b抗體也涵蓋半胱氨酸工程改造的變體，該變體包括一個或多個引入的游離半胱氨酸氨基酸殘基。游離半胱氨酸殘基是不作為二硫橋鍵一部分的半胱氨酸殘基。半胱氨酸工程改造的變體可用於在工程改造的半胱氨酸位點處，通過例如順丁烯二醯亞胺或鹵代乙醯基與例如細胞毒性和/或成像化合物、標記、或放射性同位素等綴合。對抗體工程改造以引入游離半胱氨酸殘基的方法是本領域中已知的，參見例如WO2006/034488。

本文所提供的抗FGFR2b抗體還涵蓋Fc變體，該變體在其Fc區和/或鉸鏈區包括一個或多個氨基酸殘基修飾或取代。在某些實施例中，抗FGFR2b抗體包括一個或多個改善與新生兒Fc受體(FcRn)的pH依賴性結合的氨基酸取代。此類變體可具有延長的藥物動力學半衰期，因為該變體在酸性pH值下結合至FcRn，使其避免在轉運溶酶體中降解，然後轉位並從細胞釋放出來。對抗體和其抗原結合片段工程改造以改善與FcRn的結合親和力的方法是本領域中眾所周知的，參見例如Vaughn, D.等人，《結構(Structure)》，6(1): 63-73 (1998)；Kontermann, R.等人，《抗體工程(Antibody Engineering)》，第1卷，第27章：改善PK的Fc區工程改造(Engineering of the Fc region for improved PK), Springer出版, 2010；Yeung, Y.等人，《癌症研究(Cancer Research)》，70: 3269-3277 (2010)；以及Hinton, P.等人，《免疫學雜誌(J. Immunology)》，176:346-356 (2006)。

## 結合特性

本文所提供的抗FGFR2b抗體能夠特異性結合至FGFR2b和FGFR1b。在某些實施例中，本文所提供的抗體特異性結合至人FGFR2b和/或FGFR1b且其結合親和力( $K_D$ )  $\leq 10^{-6}$  M(例如 $\leq 5 \times 10^{-7}$  M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$  M、 $\leq 10^{-7}$  M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$  M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$  M、 $\leq 10^{-8}$  M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$  M、 $\leq 4 \times 10^{-9}$  M、 $\leq 3 \times 10^{-9}$  M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$  M、 $\leq 10^{-9}$  M、 $\leq 9 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 8 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 7 \times$

$10^{-10}$  M、 $\leq 6 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 5 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 4 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 3 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 2.5 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 2 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 1.5 \times 10^{-10}$  M、 $\leq 10^{-10}$  M、 $\leq 9 \times 10^{-11}$  M、 $\leq 5 \times 10^{-11}$  M、 $\leq 4 \times 10^{-11}$  M、 $\leq 3 \times 10^{-11}$  M、 $\leq 2 \times 10^{-11}$  M、或 $\leq 10^{-11}$  M)。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體能夠特異性結合至人FGFR2b且其結合親和力( $K_D$ )不超過  $5 \times 10^{-9}$  M、不超過  $4 \times 10^{-9}$  M、不超過  $3 \times 10^{-9}$  M、不超過  $2 \times 10^{-9}$  M、不超過  $10^{-9}$  M、不超過  $5 \times 10^{-10}$  M、不超過  $4 \times 10^{-10}$  M、不超過  $3 \times 10^{-10}$  M、不超過  $2 \times 10^{-10}$  M、不超過  $10^{-10}$  M、不超過  $5 \times 10^{-11}$  M、或不超過  $4 \times 10^{-11}$  M、不超過  $3 \times 10^{-11}$  M、不超過  $2 \times 10^{-11}$  M，該  $K_D$  是通過 Biacore 測量。

在一些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體能夠特異性結合至人FGFR1b且其結合親和力( $K_D$ )不超過  $5 \times 10^{-9}$  M、不超過  $4 \times 10^{-9}$  M、不超過  $3 \times 10^{-9}$  M、不超過  $2 \times 10^{-9}$  M、不超過  $10^{-9}$  M、不超過  $5 \times 10^{-10}$  M、不超過  $4 \times 10^{-10}$  M、不超過  $3 \times 10^{-10}$  M、不超過  $2 \times 10^{-10}$  M、不超過  $10^{-10}$  M、不超過  $5 \times 10^{-11}$  M、或不超過  $4 \times 10^{-11}$  M、不超過  $3 \times 10^{-11}$  M、不超過  $2 \times 10^{-11}$  M，該  $K_D$  是通過 Biacore 測量。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗體與食蟹獼猴FGFR對應物、大鼠FGFR對應物和小鼠FGFR對應物交叉反應。

抗體與人FGFR2b和/或FGFR1b的結合也可由“半數最大有效濃度”(EC<sub>50</sub>)值表示，EC<sub>50</sub>是指觀察到50%的最大作用(例如結合或抑制作用等)的抗體濃度。EC<sub>50</sub>值可通過

本領域中已知的方法，例如夾心測定法如ELISA、蛋白質印跡法、流式細胞術測定法和其它結合測定法測量。在某些實施例中，本文所提供的抗體以不超過5 nM、不超過4 nM、不超過3 nM、不超過2 nM、不超過1.5 nM、不超過1 nM、不超過0.9 nM、不超過0.8 nM、不超過0.7 nM、不超過0.6 nM、不超過0.5 nM、不超過0.4 nM、不超過0.3 nM、不超過0.2 nM或不超過0.1 nM的 $EC_{50}$ (即，50%結合濃度)特異性結合至人FGFR2b和/或FGFR1b，該 $EC_{50}$ 通過ELISA測量。在某些實施例中，本文所提供的抗體以不超過10 nM、不超過9 nM、不超過8 nM、不超過7 nM、不超過6 nM、不超過5 nM、不超過4 nM、不超過3 nM、不超過2 nM、不超過1 nM、不超過0.8 nM、不超過0.5 nM或不超過0.3 nM之 $EC_{50}$ (即，50%結合濃度)特異性結合至人FGFR2b和/或FGFR1b，該 $EC_{50}$ 是通過流式細胞術測量。

在某些實施例中，本文所提供的抗體還能夠特異性結合至食蟹獼猴FGFR2b和/或FGFR1b、和/或大鼠/小鼠FGFR2b和/或FGFR1b。在某些實施例中，本文所提供的抗體對人FGFR2b和/或FGFR1b的結合親和力類似於對大鼠/小鼠FGFR2b FGFR1b的結合親和力。

在某些實施例中，本文所提供的抗體對人FGFR2b和/或FGFR1b的特異性結合親和力足以實現診斷和/或治療用途。

在某些實施例中，本文所提供的抗體阻斷人FGFR2b和/或FGFR1b與其配體的結合並由此提供生物活性，包含

例如抑制表達FGFR2b和/或FGFR1b的細胞的增殖。

增殖抑制作用可以用“50%生長抑制濃度”(GI<sub>50</sub>)值表示，GI<sub>50</sub>是指觀察到50%的最大增殖抑制作用的化合物的濃度。GI<sub>50</sub>值可通過本領域中已知的方法測量，例如3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鹽(MTS)比色測定法(參見美國專利第5,185,450號中的描述)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)測定法(參見Berridge等人,《生物技術年評(Biotechnol Annu Rev.)》2005; 11:127-52)、阿爾瑪藍測定法(Alamarblue assay)(參見美國專利第5,501,959號中的描述)以及測定指導手冊(Assay Guidance Manual)(Sittampalam等人編輯, 2004)中所描述的任何其它方法。在某些實施例中,本文所提供的抗體能夠抑制在細胞表面上表達人FGFR2b的細胞的增殖並且如通過MTS所測量,其50%生長抑制濃度(GI<sub>50</sub>)不超過15nM、不超過14nM、不超過13nM、不超過12nM、不超過11nM、不超過10nM、不超過9nM、不超過8nM、不超過7nM、不超過6nM、不超過5nM、不超過2nM或不超過1nM。

## 抗原結合片段

本公開還提供可以特異性結合至FGFR2b和/或FGFR1b的抗原結合片段。本領域中已知各種類型的抗原結合片段並且其可基於本文所提供的抗FGFR2b抗體開發,包含例如CDR和可變序列如SEQ ID NO:1-7中和表2中所示的例示

性抗體，以及其含有修飾或取代的不同變體。

在某些實施例中，本文所提供的抗FGFR2b抗原結合片段是駱駝化單域抗體、雙抗體、單鏈Fv片段(scFv)、scFv二聚體、BsFv、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、雙特異性抗體、二硫鍵穩定的雙功能抗體、納米抗體、域抗體、單域抗體或二價域抗體。

各種技術可用於製造此類抗原結合片段。示例性方法包含酶消化完整抗體(參見例如Morimoto等人,《生物化學與生物物理學方法雜誌(Journal of Biochemical and Biophysical Methods)》24:107-117(1992);以及Brennan等人,《科學(Science)》,229:81(1985))、由宿主細胞如大腸桿菌重組表達(例如對於Fab、Fv和ScFv抗體片段)、自如上文所論述的噬菌體展示文庫篩選(例如對於ScFv)以及兩個Fab'-SH片段化學偶合形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等人,《生物技術(Bio/Technology)》10:163-167(1992))。用於製造抗體片段的其它技術對於熟練技術人員是顯而易見的。

在某些實施例中，抗原結合片段是scFv。scFv的產生描述於例如WO 93/16185；美國專利第5,571 894號和第5,587,458號中。ScFv可在氨基或羧基末端處與效應蛋白融合以提供融合蛋白(參見例如《抗體工程》，Borrebaeck編)。

## 綴合物

在一些實施例中，抗FGFR2b抗體進一步包括綴合物部分。所述綴合物部分可連接至本文所提供的抗體。綴合物部分是可連接至抗體的非蛋白質或肽部分。考慮多種綴合物部分可連接至本文所提供的抗體(參見例如“綴合型疫苗(Conjugate Vaccines)”，對微生物學與免疫學的貢獻(Contributions to Microbiology and Immunology), J.M.Cruse 和 R.E.Lewis, Jr.(編), Carger Press, 紐約(1989))。綴合物部分可通過共價結合、親和力結合、嵌入、配位結合、複合、締合、共混合或添加等方法連接至所述抗體。

在某些實施例中，抗FGFR2b抗體通過連接子連接至一個或多個綴合物。在某些實施例中，連接子是胼連接子、二硫化物連接子、雙官能連接子、二肽連接子、葡萄糖苷酸連接子或硫醚連接子。在某些實施例中，連接子是溶酶體可切割的二肽，例如纈氨酸-瓜氨酸(vc)。

綴合物部分可以是治療劑(例如細胞毒性劑)、放射性同位素、可檢測標記(例如鐳系元素、發光標記、螢光標記或酶-底物標記)、藥物動力學調節部分或純化部分(如磁珠或納米粒子)。

可檢測標記的實例可包含用於檢測的螢光標記(例如螢光素、羅丹明(rhodamine)、丹磺醯基、藻紅蛋白或德克薩斯紅(Texas Red))、酶-底物標記(例如辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、螢光素酶、葡糖澱粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或 $\beta$ -D-半乳糖苷酶)、放射性同位素、發光標記、發色部分、地高辛(digoxigenin)、生物素/抗生物素蛋白、DNA分

子或金。

放射性同位素的實例可包含  $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ 和其它鐳系元素。放射性同位素標記的抗體可用于受體靶向成像實驗。

在某些實施例中，藥物動力學調節部分可以是有助於增加抗體半衰期的清除調節劑。示例性實例包含水溶性聚合物，如PEG、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙醇醇、聚乙醇吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇共聚物等。所述聚合物可具有任何分子量，並且可以是分支或未分支的。與抗體連接的聚合物的數量可以變化，並且如果連接多個聚合物，它們可以是相同或不同的分子。

在某些實施例中，綴合物部分可以是純化部分，如磁珠或納米粒子。

## 抗體-藥物綴合物

在某些實施例中，本文所提供的綴合物是抗體-藥物綴合物(ADC)，其包含與細胞毒性劑綴合的任何以上抗FGFR2b抗體中。換句話說，綴合物部分包含細胞毒性劑。

ADC可用於局部遞送細胞毒性劑，例如以治療癌症。這允許將細胞毒性劑靶向遞送至腫瘤和其中的細胞內積累，它特別適用於全身施用這些未綴合的細胞毒性劑可能

對正常細胞以及欲消除的腫瘤細胞引起不可接受水準的毒性的情形(Baldwin等人(1986),《柳葉刀(Lancet)》,603-05; Thorpe, (1985),《單克隆抗體(Monoclonal Antibodies)》,84; Pinchera等人(編),《生物與臨床應用(Biological And Clinical Applications)》,475-506; Syrigos和Epenetos (1999),《抗癌研究(Anticancer Research)》19:605-614; Niculescu-Duvaz和Springer (1997)《先進藥物遞送評論(Adv. Drg Del. Rev.)》26:151-172; 以及美國專利第4,975,278號)。

“細胞毒性劑”可以是對癌細胞有害或可損傷或殺滅癌細胞的任何藥劑。在某些實施例中,細胞毒性劑任選地是化學治療劑(如生長抑制劑、DNA烷基化劑、拓撲異構酶抑制劑、微管蛋白結合物或其它抗癌藥)、毒素或高反應性放射性同位素。

細胞毒性劑的實例包含大分子細菌毒素和植物毒素,如白喉毒素、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素、相思子毒素、莫迪素(modeccin)、 $\alpha$ -八疊球菌素(alpha-sarcin)、油桐蛋白質、康乃馨蛋白質、洋商陸蛋白質(PARI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒素、肥阜草抑制劑、白樹素、局限麴菌素、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)和單端孢黴烯(參見例如WO 93/21232)。此類大分子毒素可使用本領域中已知的方法,例如 Vitetta等人(1987)《科學》,238:1098中所描述的方法與本文所提供的

抗體綴合。

細胞毒性劑也可以是小分子毒素和化學治療藥物，如格爾德黴素(geldanamycin)(Mandler等人(2000)《國家癌症研究所雜誌(Jour. of the Nat.Cancer Inst.)》92(19):1573-1581；Mandler等人(2002)《生物綴合化學(Bioconjugate Chem.)》13:786-791)、類美登素(maytansinoids)(EP 1391213；Liu等人(1996)《美國國家科學院院刊》93:8618-8623)、卡奇黴素(calicheamicin)(Lode等人(1998)《癌症研究》58:2928；Hinman等人(1993)《癌症研究》53:3336-3342)、紫杉醇(taxol)、細胞鬆弛素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、長春新城(vincristine)、長春城(vinblastine)、長春地辛(vindesine)、秋水仙碱(colchicin)、小紅莓(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-去氫睪固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)、嘌呤黴素(puromycin)和其類似物、抗代謝物(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、達卡巴嗪(decarbazine))、烷基化劑(例如甲氯芥(mechlorethamine)、塞替呱(thioepa)苯丁

酸氮芥 (chlorambucil)、美法侖 (melphalan)、卡莫司汀 (carmustine)(BSNU)和洛莫司汀 (lomustine)(CCNU)、環硫磷醯胺、白消安 (busulfan)、二溴甘露醇 (dibromomannitol)、鏈佐黴素 (streptozotocin)、絲裂黴素 C (mitomycin C) 和順 - 二氯二胺鉑 (II)(DDP)(順鉑 (cisplatin))、蒽環黴素 (anthracyclines)(例如柔紅黴素 (先前稱為道諾黴素 (daunomycin)) 和多柔比星 (doxorubicin))、抗生素 (例如放線菌素 D (dactinomycin)(先前稱為放線菌素)、博萊黴素 (bleomycin)、光神黴素和安黴黴素 (anthramycin)(AMC))、以及抗有絲分裂劑 (例如長春新城和長春城)、卡奇黴素、類美登素、海兔毒素 (dolastatins)、奧瑞他汀 (auristatins)(如單甲基奧瑞他汀 E (MMAE) 和單甲基奧瑞他汀 F (MMAF))、單端孢黴烯和 CC1065，以及其具有細胞毒性活性的衍生物。此類毒素可使用本領域中已知的方法，例如 US7,964,566；Kline, T. 等人，《藥物研究 (Pharmaceutical Research)》32(11):3480-3493 中所描述的方法與本文所提供的抗體綴合。

細胞毒性劑還可以是高放射性同位素。實例包含  $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$  和  $\text{Lu}$  的放射性同位素。將放射性同位素與抗體綴合的方法是本領域中已知的，例如通過適合配體試劑綴合 (參見例如 WO94/11026；《免疫學實驗室指南 (Current Protocols in Immunology)》，第 1 和 2 章，Coligen 等人編，Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991))。配體試劑具有

能與放射性同位素金屬結合、螯合或以其它方式絡合的螯合配體，並且還具有與抗體或抗原結合片段中半胱氨酸的硫醇基具有反應性的官能團。例示性螯合配體包含 DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA 和 TETA(德克薩斯州達拉斯(Dallas, Tex.)的 Macrocyclics)。

在某些實施例中，抗體通過連接子，例如胼連接子、二硫化物連接子、雙官能連接子、二肽連接子、葡萄糖苷酸連接子或硫醚連接子連接至綴合物部分。

例示性雙官能連接子包含例如 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞氨基硫雜環戊烷(IT)、亞氨基酯的雙官能衍生物(如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(如戊二醛)、雙疊氮基化合物(如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(如 2,6-二異氰酸甲苯酯)以及雙活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

在某些實施例中，連接子在特定生理環境下是可切割的，由此促進細胞毒性劑在細胞中釋放。例如，連接子可以是酸不穩定性連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、二甲基連接子或含二硫基的連接子(Chari 等人, 《癌症研究》52:127-131(1992)；美國專利第 5,208,020 號)。在一些實施例中，連接子可包括氨基酸殘基，如二肽、三肽、四肽或五肽。連接子中的氨基酸殘基可以是天

然或非天然存在的氨基酸殘基。此類連接子的實例包含：纈氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或alaph)、甘氨酸-纈氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)、纈氨酸-瓜氨酸-對氨基苯甲氧基羰基(“vc-PAB”))。可設計和優化氨基酸連接子組分被特定酶，例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C和D、或纖維蛋白溶酶蛋白酶進行酶裂解的選擇性。

在某些實施例中，在本文所提供的ADC中，抗體(或抗原結合片段)與一種或多種細胞毒性劑以約1比約20、約1比約6、約1比約3、約1比約2、約1比約1、約2比約5或約3比約4的抗體:藥劑比率綴合。

本文所提供的ADC可通過本領域中已知的任何適合方法製備。在某些實施例中，抗體的親核性基團先與雙官能連接子試劑反應，接著連接至細胞毒性劑，或反之亦然，即，細胞毒性劑的親核性基團先與雙官能連接子反應，接著連接至抗體。

在某些實施例中，細胞毒性劑可以含有(或被修飾成含有)硫醇基反應性官能團，該官能團可與本文所提供的抗體中游離半胱氨酸的半胱氨酸硫醇基反應。例示性硫醇基反應性官能團包含例如順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶基二硫化物、鹵代乙醯基、琥珀醯亞胺基酯(例如NHS、N-羥基琥珀醯亞胺)、異硫氰酸酯、磺醯氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯基酯或氨基磷酸酯(Haugland, 2003, 《Molecular Probes 螢光探針與研究化合物手冊(Molecular

Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals)》, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, 《生物綴合化學》3:2; Garman, 1997, 《非放射性標記實踐方法 (Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach)》, Academic Press, London; Means(1990) 《生物綴合化學》1:2; Hermanson, G., 《生物綴合技術 (Bioconjugate Techniques)》 (1996) Academic Press, San Diego, 第40-55頁, 643-671)。

細胞毒性劑或抗體可與連接試劑反應，隨後綴合形成ADC。例如，可形成、分離、純化和/或表徵細胞毒性劑的N-羥基琥珀醯亞胺基酯(NHS)，或其可原位形成並與抗體的親核性基團反應。

在一些實施例中，細胞毒性劑和抗體可在一個步驟中通過原位活化和反應連接以形成ADC。在另一個實例中，抗體可與生物素綴合，接著與第二綴合物間接地綴合，該第二綴合物與抗生物素蛋白綴合。

在某些實施例中，綴合物部分隨機地連接至抗體中表面暴露的特定類型的氨基酸殘基，例如半胱氨酸殘基或賴氨酸殘基。

在某些實施例中，綴合物部分連接至明確地確定的位點以提供在藥物/抗體比(DAR)和連接位點方面具有高度均一性和批次間一致性的ADC群體。在某些實施例中，綴合物部分通過天然氨基酸、非天然氨基酸、短肽標籤或Asn297聚糖連接至抗體分子中明確地確定的位點。例如，

綴合可以在表位結合部分外部的特定位點發生。

位點特異性連接可通過用氨基酸取代抗體特定位點處的原生氨基酸，或在抗體特定位點之前/之後引入氨基酸來實現，所述氨基酸為藥物部分可綴合的氨基酸如半胱氨酸(參見Stimmel等人(2000), JBC, 275(39):30445-30450; Junutula 等人(2008), 《自然·生物技術(Nature Biotechnology)》, 26(8):925-932; 以及WO2006/065533)。或者，位點特異性綴合可如Axup等人((2012), 《美國國家科學院院刊》109(40):16101-16116)所描述，通過將抗體工程改造成在其重鏈和/或輕鏈中的特定位點處含有非天然氨基酸(例如對乙醯基苯丙氨酸(pAcF)、N6-((2-疊氮基乙氧基)羰基)-L-賴氨酸、對疊氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)和硒半胱氨酸(Sec))實現，其中所述非天然氨基酸提供額外優勢，即可設計正交化學以連接該連接子試劑和藥物。可用於兩種上述位點特異性綴合方法中的例示性特定位點(例如輕鏈V205、重鏈A114、S239、H274、Q295、S396等)在許多現有技術中有描述，例如Strop等人(2013), 《化學與生物學(Chemistry & Biology)》, 20, 161-167; Qun Zhou (2017), 《生物醫學(Biomedicines)》, 5, 64; Dimasi 等人(2017), 《分子製藥學(Mol. Pharm.)》, 14, 1501-1516; WO2013/093809和WO2011/005481。另一種位點特異性ADC綴合方法是聚糖介導的綴合，其中藥物-連接子可與位於CH2域中的Asn297聚糖(如岩藻糖、半乳糖、N-乙醯基半乳糖胺、N-乙醯氨基葡萄糖、唾液酸)綴

合，而非將疏水性相對較強的細胞毒性劑偶合至抗體的氨基酸主鏈中。也曾嘗試通過特定位點(例如N末端或C末端區域中的位點)將獨特短肽標籤(如LLQG、LPETG、LCxPxR)引入抗體中，接著使肽標籤中的特定氨基酸官能化並與藥物-連接子偶合(Strop等人(2013),《化學與生物學》, 20, 161-167; Beerli等人(2015),《公共科學圖書館·綜合(PLoS ONE)》, 10, e0131177; Wu等人2009),《美國國家科學院院刊》 106, 3000-3005; Rabuka (2012),《自然·實驗手冊(Nat. Protoc.)》 7, 1052-1067)。

## 多核苷酸和重組方法

本公開提供了分離的多核苷酸，其編碼本文所提供的抗FGFR2b抗體。

如本文所使用，術語“多核苷酸”是指呈單鏈或雙鏈形式的去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)和其聚合物。除非明確限制，否則該術語涵蓋含有天然核苷酸的已知類似物的多核苷酸，所述天然核苷酸的已知類似物具有與參照核酸類似的結合特性並且以與天然存在的核苷酸類似的方式代謝。除非另外指示，否則特定多核苷酸序列還隱含地涵蓋其保守修飾變體(例如簡並密碼子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互補序列，以及明確指示的序列。確切地說，簡並密碼子取代可以通過產生以下序列來實現，在所述序列中，一個或多個選定(或全部)密碼子的第三位被混合碱基和/或去氧肌苷殘基取代(Batzer等人，

《核酸研究》，19:5081 (1991)；Ohtsuka等人，《生物化學雜誌(J. Biol. Chem.)》，260:2605-2608 (1985)；以及Rossolini等人，《分子與細胞探針(Mol. Cell. Probes)》8:91-98(1994))。

在某些實施例中，分離的多核苷酸包括如SEQ ID NO: 9、11、13、15、17中所示的一個或多個核苷酸序列和/或其同源序列，和/或其僅具有簡並取代的變體，所述同源序列具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性，並且所述多核苷酸編碼本文所提供的例示性抗體的可變區。編碼單克隆抗體的DNA易於使用常規程序分離和測序(例如通過使用能夠與編碼抗體重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針)。編碼DNA也可通過合成方法獲得。

編碼抗FGFR2b抗體的分離的多核苷酸(例如包含如表3中所示的序列)可使用本領域中已知的重組技術插入載體中以便進一步克隆(DNA擴增)或表達。有很多載體可供使用。載體組分一般包含但不限於以下一種或多種：信號序列、複製起點、一個或多個標記物基因、增強子元件、啟動子(例如SV40、CMV、EF-1 $\alpha$ )和轉錄終止序列。載體還可以包含有助於其進入細胞的材料，包含但不限於病毒顆粒、脂質體或蛋白質包膜。

本公開提供了載體(例如克隆載體或表達載體)，其含有編碼所述抗體的本文所提供的核酸序列、可操作地連接

至所述核酸序列的至少一個啟動子(例如SV40、CMV、EF-1 $\alpha$ )及至少一個選擇標記物。載體的其實例包含但不限於質粒；噬菌粒；柯斯質粒(cosmid)；和人工染色體，如酵母人工染色體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)或P1源性人工染色體(PAC)；噬菌體，如 $\lambda$ 噬菌體或M13噬菌體；以及動物病毒。用作表達載體的動物病毒的種類包含逆轉錄病毒(包含慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒(例如單純疱疹病毒)、痘病毒、杆狀病毒、乳頭瘤病毒和乳多空病毒(例如SV40)。例示性質粒包含pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等。

包含編碼抗體或抗原結合片段的多核苷酸序列的載體可被引入宿主細胞中進行克隆或基因表達。適合克隆或表達本文所提供的載體的DNA的宿主細胞是上述原核生物、酵母或高等真核細胞。用於此目的的適合原核生物包含真細菌，如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科(*Enterobacteriaceae*)，如

埃希氏菌屬 (*Escherichia*)，例如大腸桿菌；腸桿菌屬 (*Enterobacter*)；歐文氏菌屬 (*Erwinia*)；克雷伯氏菌屬 (*Klebsiella*)；變形桿菌屬 (*Proteus*)；沙門氏菌屬 (*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*)；沙雷氏菌屬 (*Serratia*)，例如粘質沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)；和志賀桿菌屬 (*Shigella*)，以及芽孢桿菌屬 (*Bacilli*)，如枯草芽孢桿菌 (*B. subtilis*)和地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*)；假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)，如綠膿桿菌；和鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)。

除原核生物外，真核微生物，如絲狀真菌或酵母也是編碼抗FGFR2b抗體的載體的適合克隆或表達宿主。釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)或常見的烘焙酵母是低級真核宿主微生物中最常用的。然而，多種其它屬、種和菌株通常可得到並且適用於本文中，如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母屬 (*Kluyveromyces*)宿主，例如乳酸克魯維酵母 (*K. lactis*)、脆壁克魯維酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克魯維酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克魯維雄酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母 (*K. thermotolerans*)和馬克斯克魯維酵母 (*K. marxianus*)；耶氏酵母屬 (*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070)；假絲酵母屬 (*Candida*)；瑞氏木黴 (*Trichoderma reesia*) (EP

244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺氏酵母屬(*Schwanniomyces*)，例如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；以及絲狀真菌，如脈孢菌屬(*Neurospora*)、青黴菌屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)和麴黴屬(*Aspergillus*)宿主，如構巢麴黴(*A. nidulans*)和黑麴黴(*A. niger*)。

適合表達此處所提供的抗體或抗原片段的宿主細胞來源於多細胞生物體。無脊椎動物細胞的實例包含植物和昆蟲細胞。已經鑒別出多種杆狀病毒株和變體以及來自如下宿主的相應容許的昆蟲宿主細胞：草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)和家蠶(*Bombyx mori*)。多種用於轉染的病毒株是公開可得的，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV的L-1變種和家蠶(*Bombyx mori*)NPV的Bm-5病毒株，並且根據本發明，這些病毒可以用作本文中的病毒，特別是用於轉染草地貪夜蛾細胞。棉、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄和煙草的植物細胞培養物也可以用作宿主。

不過，脊椎動物細胞也已引起極大關注，並且在培養物(組織培養物)中繁殖脊椎動物細胞已變成常規程序。有用哺乳動物宿主細胞系的實例是SV40轉化的猴腎CV1細胞系(COS-7，ATCC CRL 1651)；人胚腎細胞系(亞克隆成用於在懸浮培養物中生長的293或293細胞，Graham等人，

《普通病毒學雜誌(J. Gen Virol.)》 36: 59, 1977)；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；小鼠骨髓瘤細胞系(NS0, Galfrè 和 Milstein(1981), 《酶學方法(Methods in Enzymology)》 73:3-46；Sp2/0-Ag14, ATCC CRL-1581)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人, 《美國國家科學院院刊》 77:4216(1980))；小鼠塞特利氏細胞(TM4, Mather, 《生殖生物學(Biol. Reprod.)》 23: 243-251, 1980)；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人, 《紐約科學院年鑒(Annals N.Y Acad. Sci.)》 383: 44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；以及人肝腫瘤系(Hep G2)。在一些優選的實施例中，宿主細胞是培養的哺乳動物細胞，如CHO細胞、BHK細胞或NS0細胞。

在一些實施例中，宿主細胞能夠產生糖基工程改造的抗體。例如，宿主細胞系可在翻譯後修飾期間提供所需的糖基化機制。此類宿主細胞系的實例包含但不限於糖基化相關酶的活性改變(增加或減小)的細胞系，所述糖基化相關酶如氨基葡萄糖轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N-乙醯氨基葡萄糖轉移酶 III(GnTIII))、糖基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -半乳糖基轉

移酶 (GT))、唾液酸轉移酶 (例如  $\alpha(2,3)$ -唾液酸轉移酶 (ST))、甘露糖苷酶 (例如  $\alpha$ -甘露糖苷酶 II (ManII)、岩藻糖基轉移酶 (例如  $\alpha$ -1,6-岩藻糖基轉移酶基因 (FUT8)、(1,3)岩藻糖基轉移酶)、原核 GDP-6-去氧-D-來蘇-4-己酮糖還原酶 (RMD)、GDP-岩藻糖轉運蛋白 (GFT)，這些酶可以是天然的或是通過基因工程改造得到的。

在一些實施例中，宿主細胞是以缺乏功能性 FUT8、過度表達異源 GnTIII、表達原核 GDP-6-去氧-D-來蘇-4-己酮糖還原酶 (RMD) 或缺乏功能性 GFT 為特徵。FUT8 基因敲除的宿主細胞系是岩藻糖基化缺陷型的並產生無岩藻糖基化的抗體。宿主細胞系中 GnTIII 的過度表達 (參見例如 Roche 的 Glycart technology) 使得形成等分、非岩藻糖基化糖基化形式的抗體。RMD 的表達 (例如，如在來自 ProBioGen AG 的 GlymaxX<sup>®</sup> 系統中) 抑制岩藻糖從頭生物合成，並因此，由此類宿主細胞系產生的抗體也展現減少的岩藻糖基化。CHO 細胞系中 GFT 基因敲除 (參見例如 Beijing Mabworks Biotech 的技術) 阻斷岩藻糖從頭合成和岩藻糖挽救生物合成路徑並使得岩藻糖基化減少。

用上述表達或克隆載體轉化宿主細胞以產生抗 FGFR2b 抗體，並在適於誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼所需序列的基因的改良型常規營養培養基中培養。在另一個實施例中，抗體可通過本領域中已知的同源重組方法製備。

用於產生本文所提供的抗體的宿主細胞可以在多種培

養基中培養。市售培養基，如 Ham's F10(Sigma)、最小必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)以及杜爾貝科氏改良型伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma)適於培養宿主細胞。另外，Ham等人，《酶學方法》58:44(1979)；Barnes等人，《分析生物化學(Anal. Biochem.)》102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號；WO90/03430；WO87/00195；或美國再頒專利第30,985號中所述的任何培養基都可以用作宿主細胞的培養基。任何這些培養基中的都可以視需要補充激素和/或其它生長因子(如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(如氯化鈉、鈣鹽、鎂鹽和磷酸鹽)、緩衝劑(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCIN™藥物)、痕量元素(定義為通常以在微摩爾濃度範圍內的最終濃度存在的無機化合物)以及葡萄糖或等效能源。還可以包含本領域普通技術人員已知的適當濃度的任何其它必需補充劑。培養條件，如溫度、pH等，是先前用於選定用於表達的宿主細胞的培養條件，並且是本領域普通技術人員顯而易見的。

當使用重組技術時，抗體可以在細胞內、周質空間中產生，或直接分泌至培養基中。如果在細胞內產生抗體，則作為第一步，通過例如離心或超濾移除宿主細胞或溶解片段的顆粒狀碎片。Carter等人，《生物技術》10:163-167(1992)描述了用於分離抗體的程序，所述抗體被分泌

至大腸桿菌的周質空間中。簡單點說，在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺醯氟(PMSF)存在下，經約30分鐘將細胞糊漿解凍。可以通過離心移除細胞碎片。在抗體被分泌至培養基中的情況下，一般先使用市售的蛋白質濃縮過濾器，例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元濃縮來自此類表達系統的上清液。可在上述任何步驟中包含蛋白酶抑制劑，如PMSF，以抑制蛋白水解，並且可以包含抗生素以防止外來污染物生長。

由細胞製備的抗FGFR2b抗體可使用例如羧基磷灰石色譜法、凝膠電泳、透析、DEAE-纖維素離子交換色譜法、硫酸銨沉澱、鹽析以及親和色譜法純化，其中親和色譜法是優選的純化技術。

在某些實施例中，使用固定於固相上的蛋白質A對抗體和其抗原結合片段進行免疫親和純化。蛋白質A作為親和配體的適合性取決於抗體中存在的任何免疫球蛋白Fc域的種類和同種型。蛋白質A可用於純化基於人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈的抗體(Lindmark等人，《免疫學方法雜誌》62:1-13(1983)。推薦對所有小鼠同種型和人 $\gamma 3$ 使用蛋白質G(Guss等人，《歐洲分子生物學雜誌(EMBO J.)》5:1567-1575(1986))。親和配體所連接的基質通常是瓊脂糖，但也可以使用其它基質。機械穩定的基質，如受控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯，實現比用瓊脂糖所能實現更快的流動速率和更短的處理時間。當抗體包括CH3域時，Bakerbond ABX™樹脂(新澤西州菲利浦斯堡(Phillipsburg,

N.J.)的JT Baker)可用於純化。取決於待回收的抗體，用於蛋白質純化的其它技術，如離子交換柱上進行的分級分離、乙醇沉澱、反相 HPLC、二氧化矽色譜、肝素 SEPHAROSE™上進行的色譜、陰離子或陽離子交換樹脂(如聚天冬氨酸柱)上進行的色譜、色譜焦聚、SDS-PAGE 以及硫酸銨沉澱也是可用的。

在任何初步純化步驟之後，包括所關注抗體和污染物的混合物可使用 pH 值在約 2.5-4.5 之間的洗脫緩衝液，優選地以低鹽濃度(例如約 0-0.25M 鹽)進行的低 pH 疏水相互作用色譜。

## 藥物組合物

本公開另外提供藥物組合物，所述藥物組合物包含本文所提供的抗 FGFR2b 抗體和一種或多種藥學上可接受的載體。

用於本文所公開的藥物組合物的藥學上可接受的載體可包含例如藥學上可接受的液體、凝膠或固體載體、水性媒劑、非水性媒劑、抗微生物劑、等滲劑、緩衝劑、抗氧化劑、麻醉劑、懸浮/分散劑、鉗合劑或螯合劑、稀釋劑、佐劑、賦形劑或無毒輔助物質、本領域中已知的其它組分或其各種組合。

適合組分可包含例如抗氧化劑、填充劑、粘合劑、崩解劑、緩衝劑、防腐劑、潤滑劑、調味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或穩定劑，如糖和環糊精。適合抗氧化劑可包

含例如甲硫氨酸、抗壞血酸、EDTA、硫代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱氨酸、硫代甘油、硫代乙醇酸、硫代山梨糖醇、丁基化羥基苯甲醚、丁基化羥基甲苯和/或沒食子酸丙酯。如本文所公開，在如本文所提供的包括抗體或抗原結合片段和綴合物的組合物中包含一種或多種抗氧化劑，如甲硫氨酸，將減少抗體或抗原結合片段的氧化。此氧化的減少將防止或減少結合親和力損失，由此改善抗體穩定性並使保存期最長。因此，在某些實施例中，提供了包含一種或多種本文所公開的抗體以及一種或多種抗氧化劑如甲硫氨酸的組合物。還提供了通過將如本文所提供的抗體或抗原結合片段與一種或多種抗氧化劑，如甲硫氨酸混合，防止所述抗體或抗原結合片段氧化、延長其保存期和/或改善其功效的方法。

作為進一步說明，藥學上可接受的載體可包含例如水性媒劑，如氯化鈉注射液、林格氏注射液、等滲右旋糖注射液、無菌水注射液、或右旋糖和乳酸林格氏注射液；非水性媒劑，如植物來源的非揮發性油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油；抑制細菌或抑制真菌濃度的抗微生物劑；等滲劑，如氯化鈉或右旋糖；緩衝劑，如磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝劑；抗氧化劑，如硫酸氫鈉；局部麻醉劑，如鹽酸普魯卡因；懸浮劑和分散劑，如羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙烯吡咯烷酮；乳化劑，如聚山梨醇酯 80(TWEEN-80)；鉗合劑或螯合劑，如乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二醇四乙酸(EGTA)、乙醇、聚乙二醇、丙二

醇、氫氧化鈉、鹽酸、檸檬酸或乳酸。用作載體的抗微生物劑可以添加至在多劑量容器中的藥物組合物中，所述抗微生物劑包括苯酚或甲酚、汞劑、苯甲醇、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯和對羥基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯紮氯銨 (benzalkonium chloride) 以及苄索氯銨 (benzethonium chloride)。適合的賦形劑可包含例如水、生理鹽水、右旋糖、甘油或乙醇。適合的無毒輔助物質可包含例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑、溶解性增強劑或如乙酸钠、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或環糊精之類試劑。

藥物組合物可以是液體溶液、懸浮液、乳液、丸劑、膠囊、片劑、持續釋放配製物或散劑。口服配製物可包含標準載體，如藥物級甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烯吡咯烷酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。

在某些實施例中，藥物組合物被配製成可注射組合物。可注射藥物組合物可被製備成任何常規形式，如液體溶液、懸浮液、乳液或適於產生液體溶液、懸浮液或乳液的固體形式。注射用製劑可包含可立即用於注射的無菌和/或無熱原質溶液；僅在臨使用之前與溶劑組合的無菌乾燥可溶性產品，如凍乾粉，包含皮下注射片劑；可立即用於注射的無菌懸浮液；僅在臨使用之前與媒劑組合的無菌乾燥不溶性產品；以及無菌和/或無熱原質乳液。溶液可以是水性或非水性的。

在某些實施例中，單位劑量的腸胃外製劑被包裝在安

甌、小瓶或帶針注射器中。供腸胃外施用的所有制劑都應當是無菌且無熱原質的，正如本領域中所知和實踐的那樣。

在某些實施例中，無菌凍乾粉是通過將如本文中所公開的抗體或抗原結合片段溶解于適合溶劑中製備。溶劑可以含有賦形劑，所述賦形劑將改善粉末或其它藥理學成分或由粉末製備的復原溶液的穩定性。可以使用的賦形劑包含但不限於水、右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖漿、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它適合的試劑。溶劑可以含有緩衝劑，如檸檬酸鹽、磷酸鈉或磷酸鉀、或本領域的技術人員已知的其它此類緩衝劑，在一個實施例中，緩衝劑大致呈中性pH值。隨後無菌過濾溶液，隨後在本領域技術人員已知的標準條件下凍幹，得到所需配製物。在一個實施例中，所得溶液將被分配到小瓶中進行凍幹。每個小瓶可以含有單次劑量或多次劑量的抗FGFR2b抗體或其組合物。小瓶過填充超出一次劑量或一組劑量所需量較少量(例如約10%)是可接受的，以便於抽取精確的樣品並精確地給藥。凍乾粉可以在適當的條件下儲存，如在約4℃至室溫下儲存。

用注射用水復原凍乾粉，得到供腸胃外施用的配製物。在一個實施例中，為進行復原，將無菌和/或無熱原質水或其它液態適合載體添加至凍乾粉中。精確量取決於所給出的選定療法，並且可以憑經驗確定。

## 使用方法

本公開還提供治療方法，所述治療方法包括：向有需要的受試者施用治療有效量的如本文所提供的抗體或抗原結合片段，由此治療或預防FGFR2b和/或FGFR1b相關病況或病症。在一些實施例中，FGFR2b和/或FGFR1b相關病況或病症是癌症，任選地，所述癌症以FGFR2b和/或FGFR1b的表達或過度表達為特徵。

癌症的實例包含但不限於卵巢癌、子宮內膜癌、乳癌、肺癌(小細胞或非小細胞肺癌)、結腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌(肝癌)、腎細胞癌(腎癌)、頭頸癌、間皮瘤、黑素瘤、肉瘤、腦腫瘤(例如神經膠質瘤，如膠質母細胞瘤)以及惡性血液病。

在一些實施例中，FGFR2b和/或FGFR1b相關病況或病症是以FGFR2b和/或FGFR1b的表達或過度表達為特徵的癌症。

FGFR2b和/或FGFR1b表達或過度表達可在診斷或預後測定法中，通過評價來自受試者的生物樣品(如來源於癌細胞或組織的樣品，或腫瘤浸潤免疫細胞)中FGFR的含量增加來確定。可使用各種方法。例如，可使用診斷或預後測定法評價細胞表面上存在的FGFR2b和/或FGFR1b的表達量(例如通過免疫組織化學測定法；IHC確定)。替代地或另外，可以例如通過螢光原位雜交(FISH；參見1998年10月公開的WO98/45479)、DNA印跡或聚合酶鏈反應(PCR)

技術，如實時定量PCR(RT-PCR)《方法(Methods)》 132: 73-80 (1990))測量細胞中編碼FGFR的核酸的水平。除上述測定法之外，本領域技術人員可以使用各種體內測定法。例如，可使患者體內的細胞暴露於抗體，所述抗體任選地用可檢測標記，例如用放射性同位素標記，並且可評價抗體與患者體內細胞的結合，例如通過外部掃描放射性或通過分析從先前暴露于抗體的患者取得的活組織檢查樣品進行評價。

本文所提供的抗體或抗原結合片段的治療有效量將取決於本領域中已知的各種因素，如受試者的體重、年齡、既往病史、當前藥物治療、健康狀態以及發生交叉反應的可能性、過敏、敏感性和不良副作用，以及施用途徑和疾病發展程度。如這些和其它情況或要求所示，本領域普通技術人員(例如醫生或獸醫)可以按比例減少或增加劑量。

在某些實施例中，本文所提供的抗體或抗原結合片段可按約0.01 mg/kg至約100 mg/kg的治療有效劑量施用。在這些實施例中的某些實施例中，抗體或抗原結合片段是以約50 mg/kg或更低的劑量施用，並且在這些實施例中的某些實施例中，劑量是10 mg/kg或更低、5 mg/kg或更低、3 mg/kg或更低、1 mg/kg或更低、0.5 mg/kg或更低、或0.1 mg/kg或更低。在某些實施例中，施用劑量可以在治療過程中改變。例如，在某些實施例中，初始施用劑量可以高於後續施用劑量。在某些實施例中，取決於受試者的反應，可以在治療過程中改變施用劑量。

可以調整劑量方案以提供最佳的期望反應(例如治療反應)。例如，可施用單次劑量，或可隨時間施用若干分次劑量。

本文所公開的抗體可通過本領域已知的任何途徑施用，如腸胃外(例如皮下、腹膜內、靜脈內(包括靜脈內輸注)、肌肉內或皮內注射)或非腸胃外(例如口服、鼻內、眼內、舌下、直腸或局部)途徑。

在一些實施例中，本文所公開的抗體可單獨施用或與一種或多種額外治療手段或藥劑組合施用。例如，本文所公開的抗體可與另一種治療劑，例如化學治療劑或抗癌藥物組合施用。

在這些實施例中的某些實施例中，與一種或多種額外治療劑組合施用的本文所公開的抗體或抗原結合片段可以與所述一種或多種額外治療劑同時施用，並且在這些實施例中的某些實施例中，所述抗體或抗原結合片段和所述額外治療劑可以作為同一藥物組合物的一部分施用。然而，與另一種治療劑“組合”施用的抗體或其抗原結合片段不必與所述藥劑同時施用或以同一組合物施用。如本文所使用的短語，在另一種藥劑之前或之後施用的抗體或其抗原結合片段被認為與所述藥劑“組合”施用，即使抗體或抗原結合片段和另一種藥劑是通過不同途徑施用的。在可能的情況下，與本文所公開的抗體組合施用的額外治療劑是根據額外治療劑的產品資訊表單中所列的時程、或根據《醫師案頭參考 2003(Physicians' Desk Reference 2003)》

(《醫師案頭參考》，第57版；Medical Economics Company; ISBN:1563634457; 第57版(2002年11月))或本領域中眾所周知的方案施用。

本公開還提供了使用抗FGFR2b抗體的方法。

在一些實施例中，本公開提供了一種檢測樣品中FGFR2b和/或FGFR1b的存在或量的方法，所述方法包括使所述樣品與抗體接觸，以及確定所述樣品中FGFR2b和/或FGFR1b的存在或量。

在一些實施例中，本公開提供了診斷受試者的FGFR2b和/或FGFR1b相關疾病或病況的方法，所述方法包括：a)使從所述受試者獲得的樣品與本文所提供的抗體接觸；b)確定所述樣品中FGFR2b和/或FGFR1b的存在或量；c)將所述FGFR2b和/或FGFR1b的存在或量與所述受試者的FGFR2b和/或FGFR1b相關疾病或病況的存在或狀態相關聯。

在一些實施例中，本公開提供了對受試者的FGFR2b和/或FGFR1b相關疾病或病況預後的方法，所述方法包括：a)使從所述受試者獲得的樣品與本文所提供的抗體接觸；b)確定所述樣品中FGFR2b和/或FGFR1b的存在或量；c)將所述FGFR2b和/或FGFR1b的存在或量與所述受試者對FGFR2b和/或FGFR1b拮抗劑的潛在反應性相關聯。

在一些實施例中，本公開提供了試劑盒，所述試劑盒包括本文所提供的抗體，該抗體任選地與可檢測部分綴合。所述試劑盒可用於檢測FGFR2b和/或FGFR1b或診斷

FGFR2b和/或FGFR1b相關疾病。

在一些實施例中，本公開還提供了本文所提供的抗體在製造用於治療將獲益於受試者體內FGFR2b和/或FGFR1b表達調節的疾病或病況的藥物中、在製造用於對FGFR2b和/或FGFR1b相關疾病或病況進行診斷/預後的診斷/預後試劑中的用途。

提供以下實例是為了更好地說明所要求的發明，而不應理解為限制本發明的範圍。以下描述的所有特定組合物、材料和方法(包括整體或部分)在本發明的範圍內。這些特定組合物、材料和方法不意在限制本發明，而僅說明在本發明的範圍內的特定實施例。在不脫離本發明範圍的情況下，本領域的技術人員無需履行發明能力即可開發出等效組合物、材料和方法。應理解，可對本文所描述的程序作出許多變化，但仍在本發明的界限內。本發明人意在將此類變化形式包含在本發明的範圍內。

## 實例

### 實例 1. 細胞和試劑

具有FGFR2b表達的人胃癌細胞系KATO III和SNU16，以及Ba/F3細胞(前B淋巴細胞)是購自美國典型培養物保藏中心(ATCC)。人食道癌細胞系KYSE180是來自北京大學(Peking University)的饋贈。上述人細胞系是根據供應商的建議培養。人腫瘤組織是從中山醫院(Zhongshan hospital)(中國)獲得，經患者同意並符合法規，並且被用於開發人

肺癌患者源性異種移植模型LC038。

為了建立基於細胞的測定以在抗體產生期間進行抗體篩選，將Ba/F3細胞工程改造成表達FGFR2b或FGFR2c。用編碼人FGFR2的2b或2c同功異型物的質粒轉染Ba/F3細胞。在用G418選擇之後，分離出具有較高FGFR2b或FGFR2c表達的單個克隆。

通過將FGFR2b(Genbank獲取編號NP\_001138391)的胞外域(“ECD域”)殘基65-267與人Fc區(殘基100-330)在DNA質粒中融合，以免疫粘附分子形式表達人FGFR2b的 $\beta$ -同功異型物(IgD2和IgD3域)。通過轉染人293F細胞(Invitrogen)表達所述蛋白質，並使用蛋白質A/G柱自培養基純化出該蛋白質。

通過標準技術，自食蟹獼猴(cyno)皮膚mRNA克隆食蟹獼猴FGFR2b ECD域的cDNA，並將氨基酸1-253與鼠類Fc融合以產生食蟹獼猴FGFR2b-Fc進行表達。也表達出人(hu)FGFR2b(NP\_001138391的65-267)或大鼠FGFR2b(NP\_001103363.1的56-308)的ECD域殘基與鼠類Fc的融合物。大鼠和小鼠FGFR2b ECD是相同的。

其他人FGFR家族成員的人Fc融合蛋白都是購自R&D Systems，包含重組FGFR1b-Fc、FGFR1c-Fc、FGFR2c、FGFR1c-Fc、FGFR3b-Fc、FGFR3c-Fc和FGFR4-Fc蛋白質。FGFR2b-Fc的 $\alpha$ -同功異型物、FGF也是購自R&D Systems。肝素是從Sigma-Aldrich獲得(SIGMA，#H3149-500KU-9)。PBMC是購自AllCell(#LP180322)。

臨床階段抗人FGFR2b特異性抗體FPA144是根據相關專利申請WO 2015/017600 A1表達。

## 實例2. 產生抗FGFR單克隆抗體

用每只小鼠50 µg初始劑量且接著每只小鼠25 µg劑量，或用每只小鼠10 µg初始劑量且接著每只小鼠5 µg劑量的含人FGFR2b(β)-Fc的CFA/IFA對Balb/c小鼠或SJL小鼠進行腹膜內免疫接種。通過ELISA確定針對人FGFR2b-Fc或人FGFR2c-Fc的血清效價。最後一次注射之後四天，提取出臍窩淋巴細胞並與小鼠骨髓瘤細胞融合。融合之後十天，先通過ELISA，針對FGFR2b(β)-Fc相對於NC-Fc(Fc片段作為陰性對照)結合篩選雜交瘤培養上清液。選出具有結合至FGFR2b(β)-Fc但不結合至NC-Fc的抗體的雜交瘤。通過初步篩選的雜交瘤經歷二次篩選研究，包含通過FACS測定與BaF3/FGFR-2b細胞和BaF3/FGFR-2c的結合、阻斷FGF配體結合、以及細胞殺滅。通過這種方式，選出若干陽性克隆，包含名為Ab 21的克隆。使用同種型特異性抗體確定由選擇的這些克隆產生的單克隆抗體的同種型。

## 實例3. Ab 21的人源化

使用標準RACE技術確定Ab 21的重鏈和輕鏈可變(VH、VL)區序列。從選出的雜交瘤細胞系提取總RNA。接著，使用SMART RACE cDNA擴增試劑盒(加利福尼亞州

帕洛阿爾托(Palo Alto, CA)的Clontech)或GeneRacer試劑盒(Invitrogen)，根據製造商的說明書產生含有5'端的全長第一鏈cDNA，並通過PCR擴增。分離並純化產物，接著進行TA克隆和測序。

接著，通過將小鼠Ab 21的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>移植至人Fc中，產生嵌合抗體Ab 21c。並且使用標準分子生物學方法設計、構建並表達人源化Ab 21。簡單地說，將小鼠Ab 21的CDR移植至人受體構架中。接著，在電腦模型表明與CDR明顯接觸的構架位置處，將來自小鼠抗體的氨基酸殘基取代成人構架氨基酸殘基，包含重鏈的M69L、A93T和R94S，但在輕鏈中無取代，其中使用Kabat編號。由此提供Ab 21的人源化抗體，稱為Ab hu21-21。Ab hu21-21重鏈CDR2中的氨基酸Asn-Gly(NG)進一步被氨基酸Asn-Arg(NR)取代，得到稱為Ab hu21-26的變體。Ab21、Ab 21c、Ab hu21-21和Ab hu21-26的重鏈或和輕鏈CDR區序列和可變區序列顯示於上述表1-3中。

具有人IgG1的完整成熟Ab hu21-26輕鏈和重鏈的氨基酸序列顯示於圖1中。

#### 實例4. Ab hu21-26的無岩藻糖基化和聚糖分析

為了產生Ab hu21-26的無岩藻糖基化形式(稱為“afhu21-26”，其中前置“af”是“無岩藻糖基化”的簡寫)，使用1,6-岩藻糖基轉移酶基因敲除(FUT8-/-)的CHOK1細胞(中國上海的Wuxi Biologics)作為宿主細胞

系，產生不含岩藻糖的抗體(即，無岩藻糖基化抗體)。將表達載體短暫轉染至FUT8-/- CHOK1中以產生無岩藻糖基化抗體，該表達載體包含編碼具有人IgG1恆定Fc的Ab hu21-26單克隆抗體的重鏈(HC)和輕鏈(LC)的核苷酸序列。

通過蛋白質A和SEC-HPLC純化Afh21-26並進行透析以交換成配製物緩衝液，並在-80℃儲存。

使用LC-MS對所產生的afhu21-26執行聚糖分析。簡單地說，在37℃下，用1 μL的12個單位/微升IdeS酶(Genovis AB)消化10 μL的10 μg抗體1小時，隨後依序添加37.5 μL的8 M鹽酸胍、2.5 μL的1 M Tris-HCl和1 μL的1 M DTT，接著在10-30℃下混合並培育30分鐘。通過反相HPLC方法分離完全還原的抗體。然後，使用LS-MS分析聚糖特徵。確定每個峰的質量並將其用於鑒別每種聚糖，且結果顯示於下表4中。

表 4. 聚糖峰的質量

| 聚糖    | 理論質量 (Da) | 測量的質量 (Da) |
|-------|-----------|------------|
| G0-GN | 24854.91  | 24856.57   |
| Man5  | 24976     | 24977.37   |
| G0    | 25058.11  | 25059.43   |
| G1    | 25220.25  | 25221.32   |

結果展示，G0F、G1F、G2F是無法檢測的並且如表5中所示的抗體接近100%無岩藻糖基化。

表 5. afhu21-26的聚糖特徵

| afhu21-26 的聚糖特徵 |      |       |       |
|-----------------|------|-------|-------|
| G0-GN           | Man5 | G0    | G1    |
| 1.9%            | 1.9% | 85.8% | 10.4% |

實例 5. 抗體的結合特徵

通過表面等離子體共振 (Biacore) 確定抗體與人 FGFR2b 或人 FGFR1b 抗原的結合。簡單地說，先通過經 4 分鐘注射 50 mM N-羥基琥珀醯胺 (NHS):200 mM ECD 域的 1:1 新鮮混合物，使 CM5 感測器晶片 (GE Healthcare Life Sciences) 活化。接著，使用胺偶合試劑盒 (GE Healthcare Life Sciences) 並使用 1M 乙醇胺作為封閉試劑，將 hFGFR2b-Fc 或 hFGFR1b-Fc 固定於活化的 CM5 感測器晶片上。獲得約 20-30 個反應單位 (RU，1 RU 表示每平方毫米結合 1 pg 蛋白質) 的抗原蛋白質。

在 HBS-EP+ 操作緩衝液 (GE Healthcare Life Sciences) (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% 表面活性劑 P20，pH 7.4) 中稀釋抗體，並將其以連續濃度 (0、6.25、12.5、25、50、100、150、200 nM) 注射，並在每個操作循環中包含 CM5 感測器晶片的表面再生。用 Biacore T200 評價軟體 (1.0 版) 計算締合常數和解離常數。如圖 2 中所示，Ab 21c (嵌合) 以及其人源化變體 Ab hu21-21 和 Ab hu21-26 展現出與人 FGFR2b 的較強結合親和力，其 KD 值在 220-489 pM 的範圍內，優於用作陽性對照的抗體 FPA144。此外，Ab 21c 在 FGFR1b 結合方面也不同於抗體 FPA144。

Ab 21c以 3.69 nM的KD值強效結合至人FGFR1b，與抗體FPA144以 225 nM的KD值極弱地結合至人FGFR1b形成對比。與Ab 21c類似，Ab hu21-21和Ab hu21-26也展現與人FGFR1b的特異性結合(數據未示出)。

為了證實選定的抗體可以結合至細胞膜上內源性形式的FGFR2b，使用表達FGFR2b的KATOIII細胞執行流式細胞術。所有抗體都在含10%驢血清(Jackson Immunogen #017-000-121)的PBS緩衝液中製備。將500,000個KATOIII細胞與100 $\mu$ l不同濃度的抗FGFR2b抗體一起在4 $^{\circ}$ C下培育60分鐘。將細胞洗滌兩次，並在暗處，在4 $^{\circ}$ C下於在100 $\mu$ l的10 $\mu$ g/ml二次IgG-Alexa488抗體(Jackson Immunogen #709546149)中培育30分鐘。用洗滌緩衝液將細胞洗滌三次並使其再懸浮，並且在流式細胞儀上進行分析。如圖3中所示，FACS數據明確地顯示，Ab 21c強效地結合至KATOIII細胞且其EC<sub>50</sub>值是約8 nM。與Ab 21c類似，Ab hu21-21和Ab hu21-26也展現與KATOIII細胞的特異性結合(數據未示出)。

用ELISA分析Ab 21c與重組食蟹獼猴、大鼠/小鼠和人FGFR2b-Fc融合蛋白的交叉物種結合。簡單地說，用在PBS中的約100微升/孔0.1  $\mu$ g/ml重組人FGFR2b-Fc、重組大鼠/小鼠FGFR2b-Fc、或重組食蟹獼猴FGFR2b-Fc蛋白質塗布96孔ELISA板過夜。接著，用含0.05% Tween20和2% BSA的PBS封閉該板，並將其與抗體樣品一起在室溫下培育60分鐘，然後在1 $\times$ TBST(Cell Signaling Technology,

#9997)中洗滌兩次，隨後與抗人IgG HRP(辣根過氧化酶)綴合物一起在室溫下培育60分鐘。用四甲基聯苯胺底物(Cell Signaling Technology, #7004)檢測HRP活性並用終止溶液(Cell Signaling Technology, #7002)停止反應。在450 nm下讀取該板。如圖4中所示，Ab 21c與不同物種的FGFR2b的結合 $EC_{50}$ 不存在顯著差異。Ab 21c對大鼠/小鼠FGFR2b的結合親和力最高，其次是人FGFR2b，接著是食蟹獼猴FGFR2b。與Ab 21c類似，Ab hu21-21和hu21-26也展現與不同物種的FGFR2b的特異性結合(數據未示出)。

類似地，用ELISA測定法表徵Ab 21與各種FGFR家族成員，即FGFR1b、FGFR3c、FGFR3b、FGFR4的結合特異性。數據示於圖5中。根據ELISA分析結果，Ab 21特異性結合至FGFR2b和FGFR1b，這與圖2中所示的數據相符，並且該抗體不結合至任何其它FGFR家族成員。與Ab 21c類似，在ELISA分析中，Ab hu21-21和Ab hu21-26也展現與FGFR2b和FGFR1b的特異性結合，但不結合至任何其它FGFR家族成員(數據未示出)。

## 實例6. 體外抑制活性

在FGFR2b工程改造的Ba/F3細胞克隆(Ba/F3-FGFR2b)中分析抗體對配體誘導的細胞增殖的抑制活性。在肝素(10  $\mu$ g/ml)存在下，將細胞以30,000個細胞/孔接種于96孔板中含有10%胎牛血清和重組人FGF7蛋白質(10 ng/mL)的RPMI1640培養基中。在培育過夜後，將不同濃度的抗

FGFR2b抗體添加至測定板中並且再培育72小時。在培育72小時之後，將20  $\mu$ l CellTiter Aqueous One Solution試劑添加至各孔中並室溫下培育各板2小時。為了測量吸光度，將25  $\mu$ l的10% SDS添加至各孔中以停止反應。在Tecan Spark 20M上，在490nm和650nm(參照波長)下測量吸光度。Ab 21c可強效地抑制FGF7誘導的BaF3細胞增殖且GI50是約10 nM。使用Prism處理Ab 21c的抑制活性數據並且圖式示於圖6中。與Ab 21c類似，Ab hu21-21和Ab hu21-26也展現出對FGF7誘導的BaF3細胞增殖的強效抑制(數據未示出)。

研究抗體對FGFR2信號傳導路徑的抑制作用。使SNU16細胞在含10% FBS的RPMI培養基中生長，接著以30,000個/孔接種並在無血清RPMI/0.1% BSA中保持過夜。接著，通過刮擦收集細胞並在冷PBS中洗滌一次，然後在2×SDS溶解緩衝液(100 mM Tris pH 6.8、4%SDS、20%甘油和1×蛋白酶和磷酸酶抑制劑(Pierce))中溶解。接著，在100℃下將溶解產物煮沸，保持10分鐘。通過BCA蛋白質測定試劑盒(Pierce)檢測蛋白質濃度並將等量的蛋白質裝載至SDS-PAGE凝膠中，接著使用iBolt(Invitrogen)將蛋白質轉印至硝化纖維素膜上，然後針對FGFR2和其下游基因ERK的磷酸化進行蛋白質印跡分析。如圖7中所示，Ab 21c處理以劑量依賴性方式引起SNU16細胞上磷酸化FGFR2和磷酸化ERK的下調。與Ab 21c類似，Ab hu21-21和Ab hu21-26也展現出磷酸化FGFR2和磷酸化ERK的下調

(數據未示出)。

通過共聚焦顯微鏡檢查檢測抗體的內化。簡單地說，在共聚焦顯微鏡檢查的當天，使用無酶解離溶液收集細胞，並製備成 $5 \times 10^5$ 個細胞的密度用於各管。用100  $\mu$ l阻斷緩衝液(10%驢血清)洗滌細胞並使細胞再懸浮，在4°C下保持30分鐘。接著，將細胞洗滌兩次並與100  $\mu$ l的10  $\mu$ g/ml Ab 21一起在4°C下培育60分鐘。洗滌細胞，並將其分成多個等分試樣放入小瓶中，其中一些保持在4°C，而另一些保持在37°C。在指定時間點，從4°C取出一個小瓶並從37°C取出一個小瓶。在洗滌和再懸浮之後，將細胞固定，接著用100  $\mu$ l的10%驢血清阻斷，隨後洗滌並與10  $\mu$ g/ml驢抗人IgG-Alexa488一起在4°C下于暗處培育30分鐘。洗滌細胞並使其再懸浮，並將5  $\mu$ l細胞懸浮液散佈於玻璃載片上(旨在得到單層細胞)，在55°C熱表面上乾燥並用5  $\mu$ l的1 $\times$  DAPI處理，隨後用玻璃蓋片密封。接著，獲取共聚焦圖像。如圖8中所示，在4°C下，不能發生內化，僅在細胞表面上觀察到Ab 21。在經歷37°C條件2小時或4小時以允許內化之後，在細胞內發現抗體(以箭頭標出)，表明抗體內化的發生。與Ab 21類似，Ab 21c、Ab hu21-21和Ab hu21-26也全部誘導細胞中抗體的內化(數據未示出)。

執行體外測定以確定抗體的ADCC活性。使用通過EasySep™人NK細胞分離試劑盒(Stemcell，#17955)從人PBMC(AllCells，CAT#PB0004F)分離的初代NK細胞作為效應細胞，以8:1的效應細胞比靶細胞(E/T)比率執行ADCC測

定。在執行FACS測定前一天，在含有10% FBS + HEPES 10 mM+丙酮酸鈉1 mM的RPMI1640中解凍人PBMC。用細胞標記物CFSE-FITC(Invitrogen，#C34554)對靶細胞KATOIII染色，保持30分鐘，接著在效應物和抗體存在下，在37℃下培育5小時。接著，細胞用活力標記物Viability stain-APC-Cy7(BD，#565388)染色。利用FACS，通過對CFSE染色和活力標記物染色呈陽性的細胞選通來確定細胞毒性裂解。數據在圖9中示出。Afh21-26顯示出明顯優於Ab 21c的ADCC活性，指示就最大裂解百分比和EC<sub>50</sub>而言，無岩藻糖基化改善Ab 21c的ADCC活性。afh21-21也獲得類似結果。

## 實例7. 抗體在腫瘤小鼠模型中的體內抗腫瘤活性

免疫缺陷裸小鼠是購自VitaRiver。所有動物研究都獲得IACUC批准，並且遵守內部和當地法規要求進行。

通過先在體外培養細胞，接著將細胞以每只小鼠 $1 \times 10^7$ 個細胞/200  $\mu$ l(混有50%Matrigel)皮下接種至小鼠的背側，當異種移植腫瘤達到300-500 mm<sup>3</sup>大小時，將其切除，切成相同大小的片段並皮下(s.c.)植入一組新的裸小鼠體內，由此建立SNU16人胃癌細胞系源性異種移植(CDX)小鼠模型。以類似方式建立LC038人肺癌患者源性異種移植(PDX)小鼠模型。簡單地說，將以手術方式從患者取出的組織(F0)切成相同大小的片段，並在手術之後2小時內，皮下植入免疫功能不全的裸小鼠(F1小鼠)體內。

當異種移植腫瘤達到400-600 mm<sup>3</sup>大小時，將其切除，切成片段並植入裸小鼠體內進行傳代，這些小鼠是F2，以此類推。

用測徑器從兩個維度測量腫瘤結節並使用下式計算腫瘤體積：腫瘤體積=(長度×寬度<sup>2</sup>)×0.52。當腫瘤體積達到150-250 mm<sup>3</sup>時，將荷瘤小鼠隨機分入治療組中。接著，從隨機分組後一天開始，一週一次/兩次用同種型對照(即，IgG1)或測試抗體(即，FPA144、afhu21-26)治療小鼠。每週兩次測量小鼠的腫瘤體積和體重並記錄原始數據。通過比較對照組與治療組之間腫瘤體積的平均變化，評估從治療開始的腫瘤生長抑制情況。計算是基於每組中相對腫瘤體積(RTV)的幾何或算術平均值。通過用初始腫瘤體積除以治療當天的腫瘤體積來計算RTV。

用afhu21-26或抗體FPA144治療的SNU16細胞和LC038 PDX細胞的體內腫瘤生長曲線分別顯示於圖10A和10B中。在兩個模型中，Afhu21-26顯示出優於抗體FPA144的抗腫瘤活性。afhu21-21也獲得類似結果。

### 實例8. 抗體藥物綴合物(ADC)的製備和其特性

向3ml含10 mg/ml Ab 21c的PBS中以2.2的TCEP/Ab摩爾比添加新鮮TCEP。在37°C水浴中培育120分鐘之後，將1/10(v/v)的N,N-二甲基乙醯胺(DMA)添加至抗體溶液中。接著，將DMA中10 mM的mc-vc-MMAE(mc=順丁烯二醯亞胺基己醯基；vc=纈氨酸-瓜氨酸連接子)以6的MMAE比抗

體摩爾比添加至Ab溶液中。將溶液室溫下保持過夜，接著用25 ml 1×PBS平衡PD-10柱。接著，將綴合混合物裝載至PD-10柱上以純化ADC。在Nanodrop中測量ADC的濃度。分別使用SEC-HPLC和HIC-HPLC進行ADC聚集和藥物/抗體比(DAR)的質量控制分析。根據標準方法計算平均DAR。以類似方式產生ADC綴合物21c-MMAF和afhu21-26-MMAE。afhu21-26-MMAE的HIC-HPLC長條圖顯示於圖11中。DAR計算值是3.76，類似於批准的ADC藥物本妥昔單抗維多汀(Brentuximab vedotin)的DAR。

對各種腫瘤異種移植模型，如LC038 PDX模型和SNU16異種移植模型中ADC的抗腫瘤活性進行評價。用afHu21-26 MMAE、21c-MMAF和21c-MMAE治療都在兩種腫瘤模型中誘導腫瘤消退(圖12A和12B)。

【序列表】

<110> 大陸商迪哲(江蘇)醫藥股份有限公司

<120> 新穎之抗 FGFR2b 抗體

<140> TW 109145973

<141> 2020-12-24

<150> PCT/CN 2019/127902

<151> 2019-12-24

<160> 19

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> HCDR1

<222> (1)..(5)

<400> 1

Asn Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> LCDR1

<222> (1)..(10)

<400> 2

Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ser Tyr Met Ser  
1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> HCDR2

<222> (1)..(17)

<400> 3

Ala Ile Tyr Pro Glu Asn Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<220>  
<221> LCDR2  
<222> (1)..(7)

<400> 4

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<220>  
<221> HCDR2  
<222> (1)..(4)

<400> 5

Arg Gly Asp Tyr  
1

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<220>  
<221> LCDR3  
<222> (1)..(9)

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 移除 NG 熱點

<220>  
<221> 修飾的 HCDR2  
<222> (1)..(17)

<400> 7

Ala Ile Tyr Pro Glu Asn Arg Asp Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 8  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化 21-26 抗體重鏈可變區氨基酸序列

<220>  
<221> Hu21-26 VH  
<222> (1)..(113)

<400> 8

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Glu Asn Arg Asp Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Thr Ser Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 9  
<211> 339  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人源化 21-26 抗體重鏈可變區編碼序列

<400> 9  
gaggtgcagc tggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaagggtg 60  
agctgcaagg ccagcggcta cacccttcacc aactactgga tgcactgggt gaggcaggcc 120  
cccggccagg gcctggagtg gatgggcgcc atctaccccg agaacaggga catcaactac 180  
aaccagaagt tcaagggcag ggtgaccctg accagggaca ccagcatcag caccgcctac 240  
atggagctga gcaggctgag gagcgacgac accgccgtgt actactgcac cagcaggggc 300  
gactactggg gccagggcac caccgtgacc gtgagcagc 339

<210> 10  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人源化 21-26/21-21 抗體輕鏈可變區氨基酸序列

<400> 10  
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ser Tyr Met  
20 25 30  
  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45  
  
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
85 90 95

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

<210> 11  
<211> 318  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化 21-26/21-21 抗體輕鏈可變區編碼序列

<400> 11  
gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 60  
atcacctgca gcgccagcag cggcctgagc tacatgagct ggtaccagca gaagcccggc 120  
aaggccccca agctgctgat ctacgacacc agcaacctgg ccagcggcgt gccagcagg 180  
ttcagcggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct gcagcccag 240  
gacttcgcca cctactactg ccagcagtgg agcagctacc cctacacctt cggccagggc 300  
accaagctgg agatcaag 318

<210> 12  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 嵌合 21 抗體重鏈可變區氨基酸序列

<400> 12

Glu Val Gln Leu His Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Glu Asn Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 13  
<211> 339  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 嵌合 21 抗體重鏈可變區編碼序列

<400> 13  
gaggttcagc tccaccagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60  
tcctgcaaga ctcttggtta cacatttacc aactactgga tgcactggat aaaacagagg 120  
cctggacagg gtctggaatg gataggggct atttatcctg aaaatggtga tattaaactac 180  
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240  
atggacctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtac aagtcggggg 300  
gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctca 339

<210> 14  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 嵌合 21 抗體輕鏈可變區氨基酸序列

<400> 14  
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ser Tyr Met  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
85 90 95

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

<210> 15  
<211> 318  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 嵌合 21 抗體輕鏈可變區編碼序列

<400> 15  
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
atgacctgca gtgccagctc aggtttaagt tacatgtcct ggtaccagca gaagccagga 120  
tcctcccccga gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt cctgttcgc 180  
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240  
gatgctgccca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cgtacacgtt cggagggggg 300  
accaagctgg aaataaaa 318

<210> 16  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化 21-21 抗體重鏈可變區氨基酸序列

<400> 16

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

1

5

10

15

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

202530

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

354045

Gly Ala Ile Tyr Pro Glu Asn Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65707580

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Thr Ser Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100105110

Ser

- <210>

17
- <211>

339
- <212>

DNA
- <213>

人工序列
- <220>
- <223>

人源化 21-21 抗體重鏈可變區編碼序列

<400>

17

gaggtgcagc

tggtgcagag

cggcgccgag

gtgaagaagc

ccggcgccag

cgtgaagg

tg

60

agctgcaagg

ccagcggcta

caccttcacc

aactactgga

tgcactgggt

gaggcaggcc

120

cccggccagg

gcctggagtg

gatgggcgcc

atctaccccg

agaacggcga

catcaactac

180

aaccagaagt

tcaagggcag

ggtgaccctg

accagggaca

ccagcatcag

caccgcctac

240

atggagctga

gcaggctgag

gagcgacgac

accgccgtgt

actactgcac

cagcaggggc

300

gactactggg

gccagggcac

caccgtgacc

gtgagcagc

339

- <210>

18
- <211>

213
- <212>

PRT
- <213>

人工序列

<220>  
<223> 人源化 21-26 抗體輕鏈氨基酸序列  
<400> 18

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ser Tyr Met  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45  
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80  
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
85 90 95  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110  
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125  
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140  
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160  
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175  
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190  
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 19  
<211> 443  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化 21-26 抗體重鏈氨基酸序列

<400> 19

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Glu Asn Arg Asp Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Thr Ser Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
100 105 110

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
165 170 175

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
| Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |

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

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

## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種分離的抗體，其包含：

a)重鏈可變區(V<sub>H</sub>)和輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，該 V<sub>H</sub>包含分別為 SEQ ID NO: 1、3及5之互補決定區(CDR) 1、2及3，且該 V<sub>L</sub>包含分別為 SEQ ID NO: 2、4及6之 CDR1、2及3；或

b)重鏈可變區(V<sub>H</sub>)和輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，該 V<sub>H</sub>包含分別為 SEQ ID NO: 1、7及5之互補決定區(CDR) 1、2及3，且該 V<sub>L</sub>包含分別為 SEQ ID NO: 2、4及6之 CDR1、2及3，

其中所述抗體能夠特異性結合至 FGFR2b和 FGFR1b兩者。

【請求項 2】如請求項 1所述的抗體，所述抗體與 FGFR2c不具有可檢測的結合親和力。

【請求項 3】如請求項 1至 2中任一項所述的抗體，其包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 8、12或 16或其同源序列，所述同源序列與 SEQ ID NO: 8、12或 16具有至少 80%序列同一性。

【請求項 4】如請求項 1至 2中任一項所述的抗體，其包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO: 10或 14或其同源序列，所述同源序列與 SEQ ID NO: 10或 14具有至少 80%序列同一性。

【請求項 5】如請求項 1至 2中任一項所述的抗體，其包含：

a)包含 SEQ ID NO: 8的重鏈可變區和包含 SEQ ID NO: 10的輕鏈可變區；

b)包含 SEQ ID NO: 12 的重鏈可變區和包含 SEQ ID NO: 14 的輕鏈可變區；或

c)包含 SEQ ID NO: 16 的重鏈可變區和包含 SEQ ID NO: 10 的輕鏈可變區。

【請求項 6】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，其還包含一個或多個氨基酸殘基取代或修飾，但仍然保持與 FGFR2b 和 FGFR1b 的特異性結合親和力。

【請求項 7】如請求項 6 所述的抗體，其中所述取代或修飾中的至少一個是在所述  $V_H$  或  $V_L$  序列的一個或多個中，但在任何所述 CDR 序列的外部。

【請求項 8】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，其還包含免疫球蛋白恆定區，任選地人免疫球蛋白的恆定區，或任選地人 IgG 的恆定區。

【請求項 9】如請求項 8 所述的抗體，其中所述恆定區包含一個或多個修飾，所述修飾：

- a)引入或移除糖基化位點，
- b)引入游離半胱氨酸殘基，
- c)增強與活化 Fc 受體的結合，和/或
- d)增強抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (ADCC)。

【請求項 10】如請求項 9 所述的抗體，所述抗體經歷糖基工程改造。

【請求項 11】如請求項 10 所述的抗體，其中所述經歷糖基工程改造的抗體相較於其未工程改造的對應物展現出增強的 ADCC 活性。

【請求項 12】如請求項 11 所述的抗體，所述抗體是無岩藻糖基化的。

【請求項 13】如請求項 12 所述的抗體，所述抗體在 Asn297 處缺乏岩藻糖。

【請求項 14】如請求項 13 所述的抗體，其中所述增強的 ADCC 是以表達 FGFR2b 的細胞的裂解提高至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70% 或 75% 為特徵。

【請求項 15】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體是嵌合抗體或人源化抗體。

【請求項 16】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體是駱駝化單域抗體、雙抗體、scFv、scFv 二聚體、BsFv、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、dsFv-dsFv'、Fv 片段、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、二硫鍵穩定的雙抗體、納米抗體、域抗體或二價域抗體。

【請求項 17】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體能夠以不超過  $1 \times 10^{-9}$  M 的  $K_D$  值特異性結合至人 FGFR2b，所述  $K_D$  值是通過 Biacore 測量。

【請求項 18】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體能夠以不超過  $5 \times 10^{-9}$  M 的  $K_D$  值特異性結合至人 FGFR1b，所述  $K_D$  值是通過 Biacore 測量。

【請求項 19】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體能夠以不超過 10 nM 的  $EC_{50}$  特異性結合至細胞表面上表達的人 FGFR2b，所述  $EC_{50}$  是通過流式細胞術測量。

【請求項 20】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體能夠特異性結合至人 FGFR2b、食蟹獼猴 FGFR2b、大鼠 FGFR2b 和小鼠 FGFR2b。

【請求項 21】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體能夠特異性結合至細胞表面上表達的人 FGFR2b 並以不超過 15 nM 的 50% 生長抑制濃度 (GI<sub>50</sub>) 抑制所述細胞的增殖，所述 GI<sub>50</sub> 是通過 3-(4,5-二甲基噁唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鹽比色測定法測量。

【請求項 22】如請求項 1 至 2 中任一項所述的抗體，所述抗體連接至一個或多個綴合物部分。

【請求項 23】如請求項 22 所述的抗體，其中所述綴合物部分包含治療劑、放射性同位素、可檢測標記、藥物動力學調節部分或純化部分。

【請求項 24】如請求項 23 所述的抗體，其中所述治療劑包含細胞毒性劑。

【請求項 25】如請求項 23 所述的抗體，其中所述綴合物部分是直接或通過連接子共價連接。

【請求項 26】如請求項 25 所述的抗體，其中所述連接子是胍連接子、二硫化物連接子、雙官能連接子、二肽連接子、葡萄糖苷酸連接子、硫醚連接子，任選地所述連接子是溶酶體可切割的二肽，例如纈氨酸-瓜氨酸 (vc)。

【請求項 27】如請求項 22 所述的抗體，其中所述綴合物部分隨機地連接至特定類型的表面暴露的氨基酸殘基，任選地所述特定殘基是半胱氨酸殘基或賴氨酸殘基。

【請求項28】如請求項22所述的抗體，其中所述綴合物部分通過天然氨基酸、非天然氨基酸、短肽標籤或 Asn297聚糖連接至抗體分子中明確定義的位點。

【請求項29】一種分離的多核苷酸，所述多核苷酸編碼如請求項1至28中任一項所述的抗體。

【請求項30】如請求項29所述的分離的多核苷酸，所述分離的多核苷酸包含選自下組的核苷酸序列：SEQ ID NO: 9、11、13、15、17，以及其同源序列，所述同源序列與SEQ ID NO: 9、11、13、15或17具有至少80%序列同一性。

【請求項31】如請求項30所述的分離的多核苷酸，其中所述同源序列編碼如SEQ ID NO: 9、11、13、15或17編碼的相同的蛋白質。

【請求項32】一種表達載體，所述表達載體包含如請求項29至31中任一項所述的分離的多核苷酸。

【請求項33】一種宿主細胞，所述宿主細胞包含如請求項32所述的表達載體。

【請求項34】如請求項33所述的宿主細胞，所述宿主細胞能夠產生糖基化工程改造的抗體或抗原結合片段。

【請求項35】如請求項33所述的宿主細胞，所述宿主細胞以缺失功能性 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基轉移酶(FUT8)、過度表達異源 $\beta$ 1,4-N乙醯氨基葡萄糖轉移酶III(GnTIII)、表達原核GDP-6-去氧-D-來蘇-4-己酮糖還原酶，或缺失功能性GDP-岩藻糖轉運蛋白(GFT)為特徵。

【請求項 36】一種產生如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體的方法，所述方法包括在使如請求項 32 所述的表達載體表達的條件下，培養如請求項 33 至 35 中任一項所述的宿主細胞。

【請求項 37】如請求項 36 所述的方法，所述方法還包括純化由所述宿主細胞產生的抗體。

【請求項 38】一種藥物組合物，其包含如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體和藥學上可接受的載體。

【請求項 39】一種如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體或如請求項 38 所述的藥物組合物在製造藥物的用途，該藥物係用於治療受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況。

【請求項 40】如請求項 39 所述的用途，其中所述疾病或病況是癌症，並且任選地，所述癌症以 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的表達或過度表達為特徵。

【請求項 41】如請求項 40 所述的用途，其中所述癌症是選自下組：卵巢癌、子宮內膜癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、結腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌、腎細胞癌、頭頸癌、間皮瘤、黑素瘤、肉瘤以及腦腫瘤。

【請求項 42】如請求項 39 所述的用途，其中所述藥物是經口、鼻、靜脈內、皮下、舌下或肌肉內施用。

【請求項 43】如請求項 39 所述的用途，其中所述受試者是人。

【請求項 44】一種檢測樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量的方法，其包括使所述樣品與如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體接觸，以及確定所述樣品中所述 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量。

【請求項 45】一種診斷受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況的方法，其包括：

a) 使從所述受試者獲得的樣品與如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體接觸；

b) 確定所述樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量；  
及

c) 將所述 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量與所述受試者的所述 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況的存在或狀態相關聯。

【請求項 46】一種對受試者的 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況預後的方法，其包括：

a) 使從所述受試者獲得的樣品與如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體接觸；

b) 確定所述樣品中 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量；  
及

c) 將所述 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的存在或量與所述受試者對 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 拮抗劑的潛在反應性相關聯。

【請求項 47】一種如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體在製造診斷試劑的用途，該診斷試劑係用於檢測 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 相關疾病或病況。

【請求項 48】一種用於檢測 FGFR2b 和 / 或 FGFR1b 的試劑盒，其包含如請求項 1 至 28 中任一項所述的抗體。

【發明圖式】

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTTITCSASSGLSYMSWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖 1A】

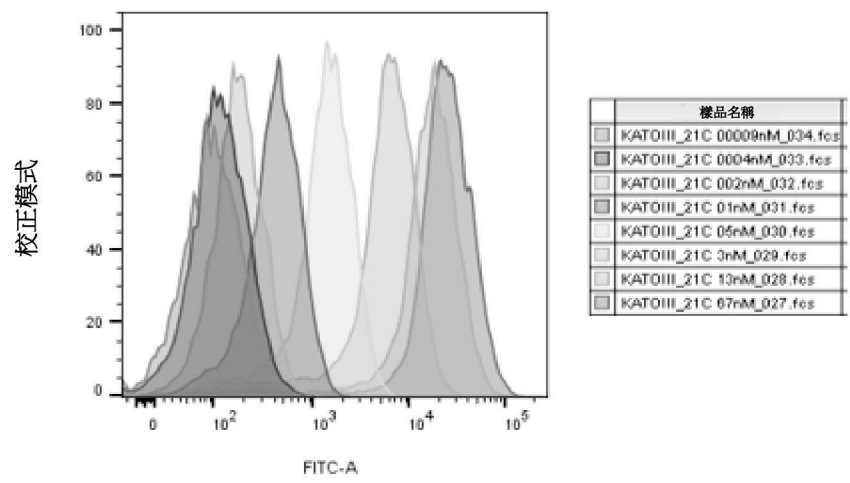
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPE  
NRDINYNQKFKGRVTLTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTSRGDYWGQGTTVT  
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【圖 1B】

| hFGFR2b   |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ab        | ka (1/Ms) | kd (1/s)  | KD (M)    |
| FPA144    | 1.035E+05 | 7.766E-05 | 7.504E-10 |
| 21c       | 9.134E+04 | 2.460E-05 | 2.693E-10 |
| hu21-21   | 9.795E+04 | 2.447E-05 | 2.498E-10 |
| afhu21-26 | 1.157E+05 | 5.584E-05 | 4.825E-10 |

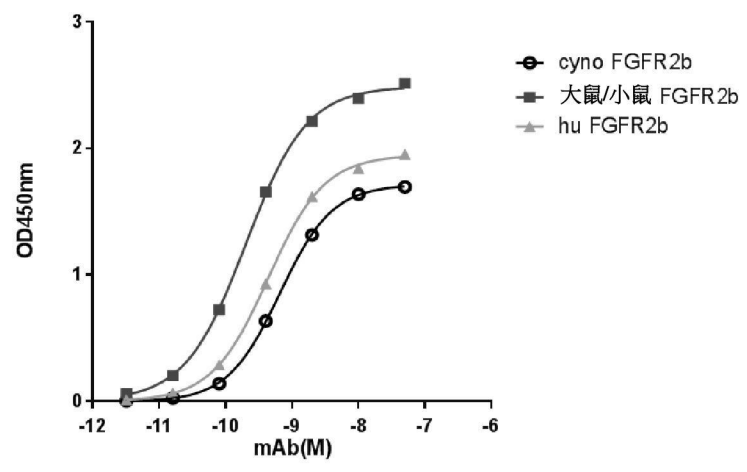
| hFGFR1b |           |          |          |
|---------|-----------|----------|----------|
| Ab      | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)   |
| FPA144  | 3.32E+04  | 7.46E-03 | 2.25E-07 |
| 21c     | 6.38E+04  | 2.35E-04 | 3.69E-09 |

【圖 2】



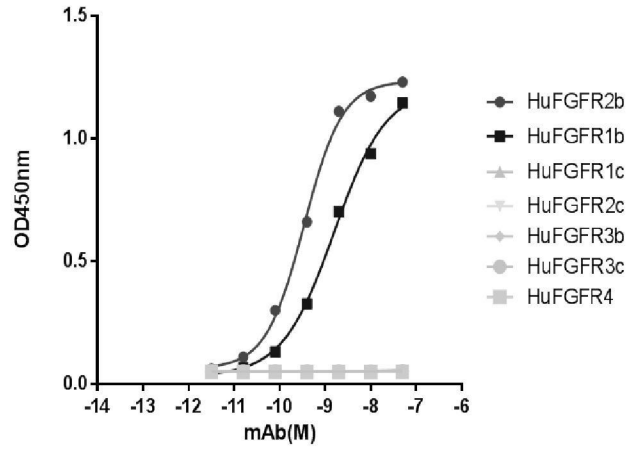
【圖 3】

21c與FGFR2b的跨物種結合

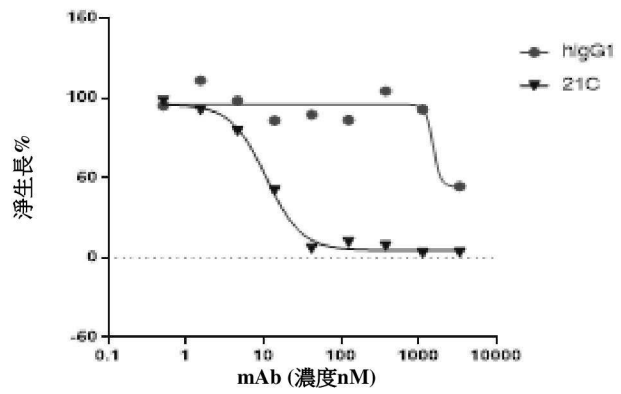


【圖 4】

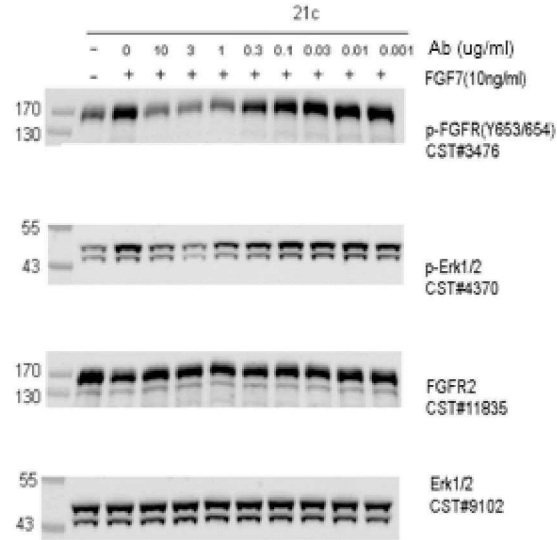
21c結合至FGFRs



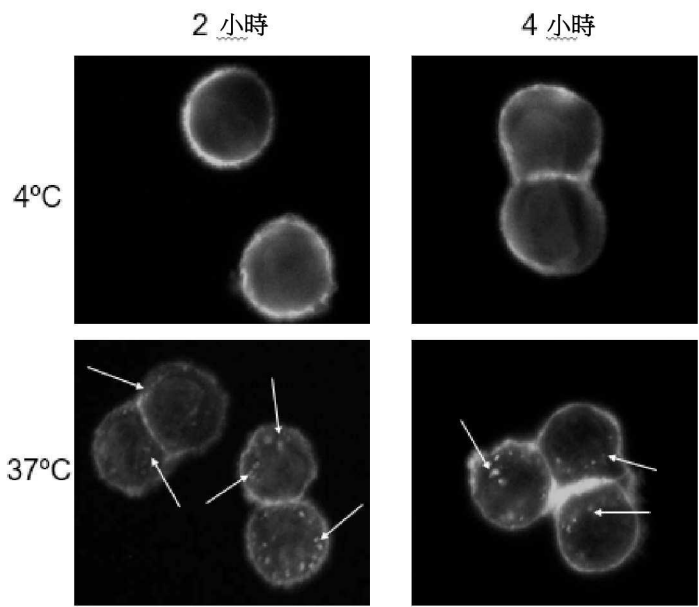
【圖 5】



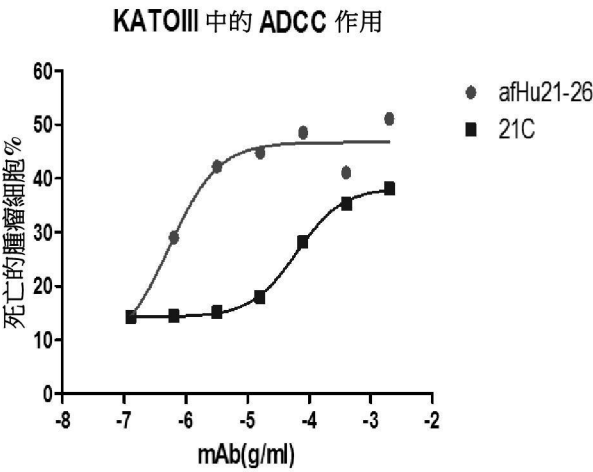
【圖 6】



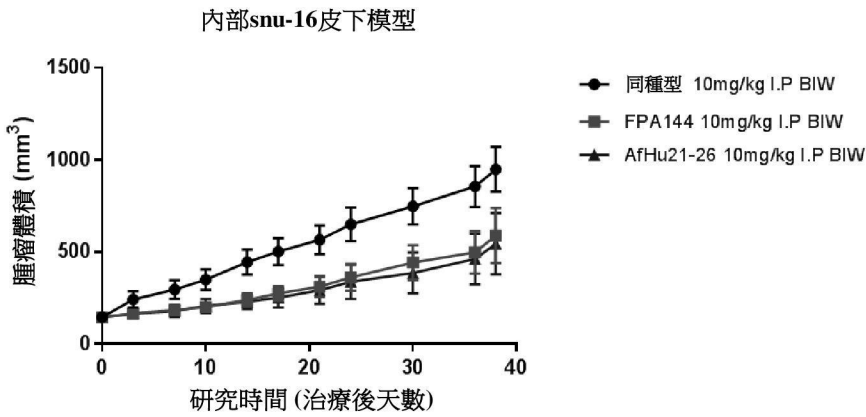
【圖 7】



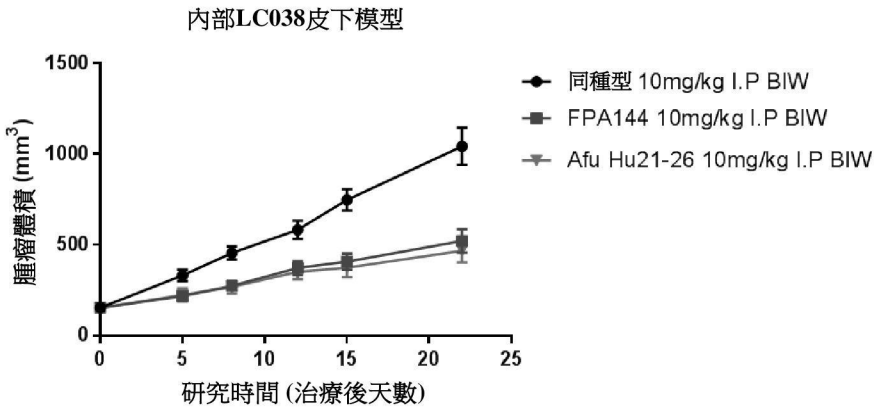
【圖 8】



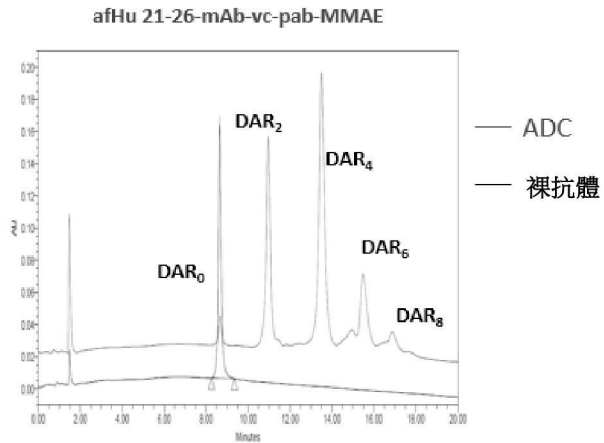
【圖 9】



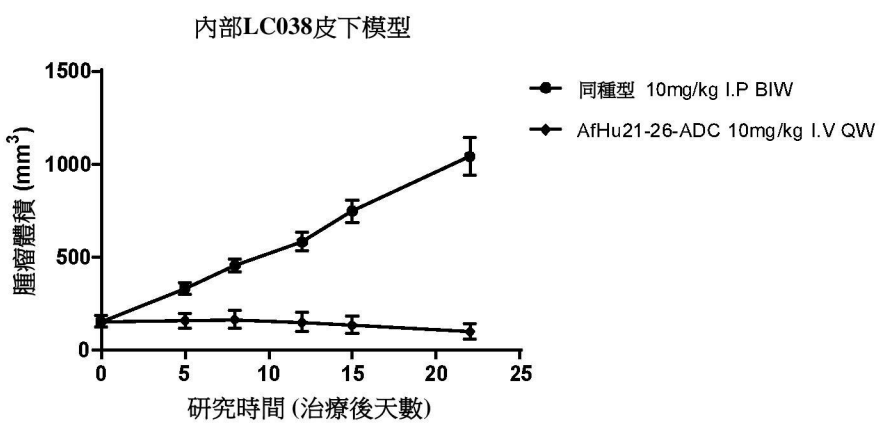
【圖 10A】



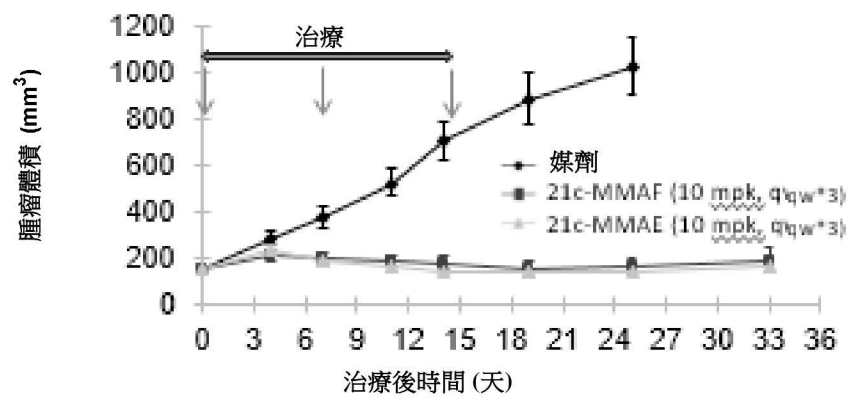
【圖 10B】



【圖 11】



【圖 12A】



【圖 12B】