



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201444574 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：103108773

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 12 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61K31/537 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/13 美國

61/780,299

(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)

瑞士

(72)發明人：伯特 大衛 布萊恩 BATT, DAVID BRYANT (US)；伊藤伯格 薩希 ETTENBERG, SETH (US)；后伯斯特 尼可 HAUBST, NICOLE (DE)；胡天岑 HU, TIANCEN (CN)；傑肯司 大衛 JENKINS, DAVID (US)；托克索 安秦 TOKSOZ, ENGIN (DE)；彼得伯勒斯 肯斯坦尼 PETROPOULOS, KONSTANTIN (DE)；墨思爾 瑞貝卡 MOSHER, REBECCA (US)；邁爾 馬修 約翰 MEYER, MATTHEW JOHN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：70 項 圖式數：21 共 226 頁

(54)名稱

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明係關於抗 FGFR2 及抗 FGFR4 抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其用於治療癌症之用途。

(A)

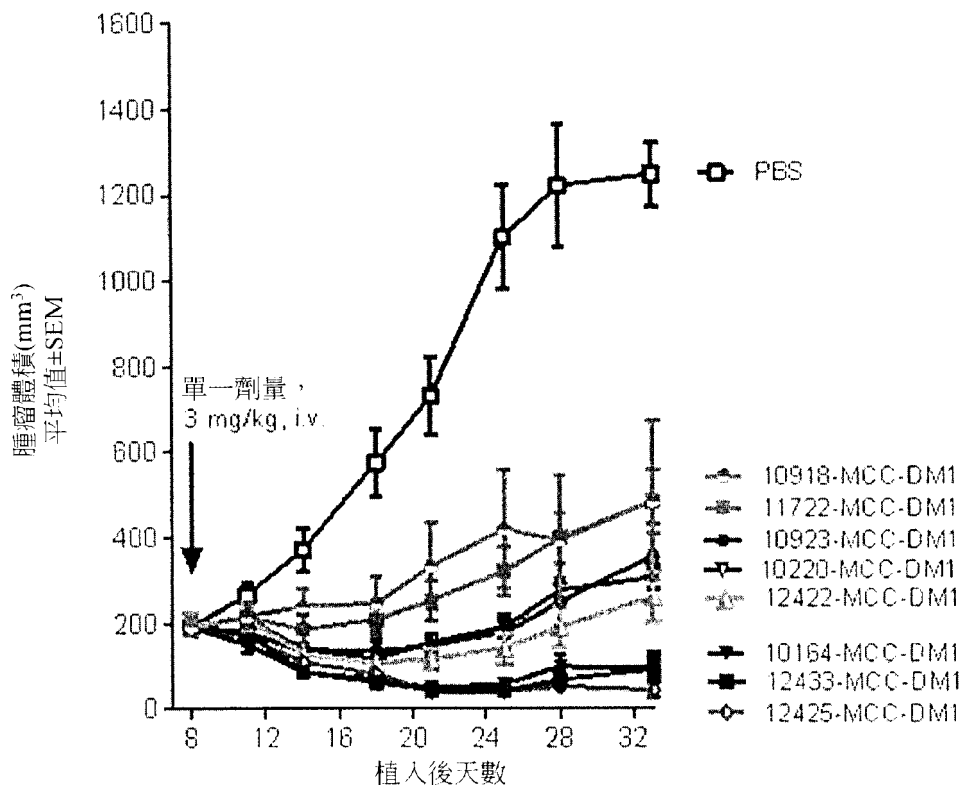


圖4



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201444574 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：103108773

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 12 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61K31/537 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/13 美國

61/780,299

(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)

瑞士

(72)發明人：伯特 大衛 布萊恩 BATT, DAVID BRYANT (US)；伊藤伯格 薩希 ETTENBERG, SETH (US)；后伯斯特 尼可 HAUBST, NICOLE (DE)；胡天岑 HU, TIANCEN (CN)；傑肯司 大衛 JENKINS, DAVID (US)；托克索 安秦 TOKSOZ, ENGIN (DE)；彼得伯勒斯 肯斯坦尼 PETROPOULOS, KONSTANTIN (DE)；墨思爾 瑞貝卡 MOSHER, REBECCA (US)；邁爾 馬修 約翰 MEYER, MATTHEW JOHN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：70 項 圖式數：21 共 226 頁

(54)名稱

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明係關於抗 FGFR2 及抗 FGFR4 抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其用於治療癌症之用途。

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】

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【技術領域】

本發明大體上係關於抗FGFR2及抗FGFR4抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其用於治療癌症之用途。

【先前技術】

纖維母細胞生長因子受體

經由FGF受體(FGFR)傳導信號的纖維母細胞生長因子(FGF)調節基本的發育途徑且表現於多種組織中。FGF刺激增殖、細胞遷移、分化且在骨骼及四肢發育、傷口癒合、組織恢復、血細胞生成、血管生成及腫瘤發生中起主要作用(參見例如Turner及Croce, Nature Reviews Cancer 10: 116-129 (2010))。

哺乳動物FGF家族包含許多配位體，該等配位體經由四種高度保守的跨膜酪胺酸激酶受體FGFR1、FGFR2、FGFR3及FGFR4發揮其作用。典型FGFR具有一個裂解的信號肽、三個免疫球蛋白(Ig)樣域(Ig域I、II及III)、一個酸性盒、一個跨膜域及一個分裂酪胺酸激酶域(參見例如Ullrich及Schlessinger, Cell 61: 203 (1990); Johnson及Williams, Adv. Cancer Res. 60: 1-41 (1992))。

另外，所轉錄受體基因之替代性拼接產生多種受體同功異型物，包括可溶性分泌型FGFR、具有截斷之COOH末端域的FGFR、具有兩或三個Ig樣域的FGFR，以及經由第三Ig樣域之替代性拼接而產生的FGFR同功異型物，且僅針對FGFR1、FGFR2及FGFR3發生，且

限定於第三個Ig樣域之另一半，產生受體同功異型物IIIb或IIIc。受體之第二個及第三個Ig樣域為配位體結合所必需且充分的，而第一個Ig樣域被認為在受體自動抑制中起作用。因此，不同受體及其同功異型物顯示不同的配位體結合特異性(參見例如Haugsten等人, *Mol. Cancer Res.* 8:1439-1452 (2010))。

FGF除結合至不同FGFR及其拼接變異體之外，亦可結合至硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)。由此在細胞表面上形成二聚FGF-FGFR-HSPG三元複合物。三元複合物藉由複合物中不同組分之間的多重相互作用而穩定化。已在受體之Ig樣域II及III內鑑別出兩個FGF結合位點：肝素結合位點及受體-受體相互作用位點。(Haugsten等人, 2010)。

FGF結合至FGFR誘導受體發生二聚合，此能夠使激酶域之活化環中的酪胺酸發生磷酸轉移。活性FGFR已顯示可使多種細胞內蛋白質(諸如FRS2及PLC γ)發生磷酸化(Eswarakumar等人, *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149 (2005))。FGFR信號傳導在不同細胞類型中產生不同的生物反應：自刺激細胞增殖及存活至生長阻滯、遷移及分化。

FGFR及癌症

FGF信號傳導介導以下作用之強效組合：獨立的生長/存活、血管新生及腫瘤細胞遷移。因此，一旦施加於其生理功能的緊密調節作用喪失，則FGF信號傳導有可能強烈致癌(參見例如Heinzle等人, *Expert Opin. Ther. Targets* 15(7):829-846 (2011))。

FGFR1、FGFR2及FGFR4之基因增殖及/或過度表現已牽涉乳癌(Penault-Llorca等人, *Int J Cancer* 1995；Theillet等人, *Genes Chrom. Cancer* 1993；Adnane等人, *Oncogene* 1991；Jaakola等人, *Int J Cancer* 1993；Yamada等人, *Neuro Res* 2002)。FGFR1及FGFR4之過度表現亦與胰腺癌及星形細胞瘤有關(Kobrin等人, *Cancer Research* 1993；

Yamanaka等人, *Cancer Research* 1993 ; Shah等人, *Oncogene* 2002 ; Yamaguchi等人, *PNAS* 1994 ; Yamada等人, *Neuro Res* 2002)。前列腺癌亦與FGFR1過度表現有關(Giri等人, *Clin Cancer Res* 1999)。FGFR4過度表現已牽涉橫紋肌肉瘤(Khan等人, *Nature Medicine* 2001 ; Baird等人, *Cancer Res* 2005)。腺泡狀橫紋肌肉瘤亞型含有PAX3-FOXO易位, 產生新穎的融合蛋白, 該融合蛋白直接轉錄式活化FGFR4且使得FGFR4蛋白表現增強 (Cao等人, *Cancer Res* 2010 ; Davicioni等人, *Cancer Res* 2006)。

一般而言, FGFR2及FGFR1更通常因基因擴增而調節異常。在胃癌中, 擴增之FGFR2基因與不良預後有關(Kunii等人, *Cancer Res.* 68:2340-2348 (2008))。FGFR2-IIIb轉變為IIIc亦可為腫瘤進展、上皮-間葉轉移以及膀胱及前列腺癌高侵入性之信號。此情況下之轉變使原致癌性IIIc受體取代發揮抗腫瘤發生活性的IIIb受體變異體(參見例如Heinzle等人, 2011)。迄今為止, FGFR2突變已牽涉皮膚癌、子宮內膜癌、卵巢癌及肺癌。FGFR4突變已牽涉橫紋肌肉瘤、肺癌及乳癌(參見例如Heinzle等人, 2011)。

抗體藥物結合物

抗體藥物結合物(「ADC」)已用於局部傳遞治療癌症的細胞毒性劑(參見例如Lambert, *Curr. Opinion In Pharmacology* 5:543-549, 2005)。ADC允許藥物部分之靶向傳遞, 其中可達成最大的功效、最小的毒性。由於顯示有前景之臨床結果的ADC愈來愈多, 因此開發用於癌症療法之新穎治療劑的需要增強。

【發明內容】

本發明提供式Ab-(L-(D)_m)_n之抗體藥物結合物, 或其醫藥學上可接受之鹽, 其中Ab為特異性結合至人類FGFR2與FGFR4的抗體或其抗原結合片段; L為連接子; D為藥物部分; m為整數1至8; 並且n為整

數1至10。在一些實施例中， m 為1。在一些實施例中， n 為3或4。在一特定實施例中， m 為1且 n 為3或4。

本發明提供特異性結合至人類FGFR2與人類FGFR4的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4，與人類FGFR2之所有同功異型物。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2上之抗原決定基，該抗原決定基包含SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基176 (Lys)及210 (Arg)。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基173 (Asn)、174 (Thr)、175 (Val)、176 (Lys)、178 (Arg)、208 (Lys)、209 (Val)、210 (Arg)、212 (Gln)、213 (His)、217 (Ile)及219 (Glu)。本發明進一步提供包含本文所述抗體或抗原結合片段的抗體藥物結合物。

在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之抗原決定基，該抗原決定基包含或由SEQ ID NO: 136或SEQ ID NO: 141組成。本發明進一步提供包含本文所述抗體或抗原結合片段的抗體藥物結合物。

本發明之抗體、抗原結合片段及抗體藥物結合物亦特異性結合至人類FGFR4。在一些實施例中，其特異性結合至人類FGFR4之D1及D2域。在一些實施例中，其特異性結合至人類FGFR4之D1或D2域。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4上之抗原決定基，該抗原決定基包含SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基169 (Lys)及203 (Arg)。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基150 (Thr)、151 (His)、154 (Arg)、157 (Lys)、160 (His)、166 (Asn)、167 (Thr)、168 (Val)、169 (Lys)、171 (Arg)、173 (Pro)、174 (Ala)、201 (Arg)、202 (Leu)、203 (Arg)、204 (His)、205 (Gln)、206 (His)、207 (Trp)、210

(Val)及212 (Glu)。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之抗原決定基，該抗原決定基包含或由SEQ ID NO: 132或SEQ ID NO: 133組成。本發明進一步提供包含本文所述抗體或抗原結合片段的抗體藥物結合物。

在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之抗原決定基及人類FGFR4之抗原決定基，人類FGFR2之該抗原決定基包含SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基176 (Lys)及210 (Arg)，人類FGFR4之該抗原決定基包含SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基169 (Lys)及203 (Arg)。

在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至包含SEQ ID NO: 137之胺基酸160-189及/或SEQ ID NO: 137之胺基酸198-216的抗原決定基。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至包含SEQ ID NO: 142之胺基酸150-174及/或SEQ ID NO: 142之胺基酸201-212的抗原決定基。在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段特異性結合至包含SEQ ID NO: 137之胺基酸160-189及/或SEQ ID NO: 137之胺基酸198-216的抗原決定基及包含SEQ ID NO: 142之胺基酸150-174及/或SEQ ID NO: 142之胺基酸201-212的第二抗原決定基。

在一些實施例中，本發明提供表1中所述之抗體、其抗原結合片段及包含此等抗體或抗原結合片段的抗體藥物結合物。在一些實施例中，本發明提供包含重鏈可變區的抗體及抗原結合片段，該重鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 1之VH CDR1，(b) SEQ ID NO: 2之VH CDR2，及(c) SEQ ID NO: 3之VH CDR3，其中CDR係根據Kabat定義加以定義。在一些實施例中，本發明之抗體或抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，該重鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 1之VH CDR1、(b) SEQ ID NO: 2之VH CDR2及(c) SEQ ID NO: 3之VH

CDR3，該輕鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 11之VL CDR1、(b) SEQ ID NO: 12之VL CDR2及(c) SEQ ID NO: 13之VL CDR3，其中CDR係根據Kabat定義加以定義。本發明進一步提供包含此等抗體或抗原結合片段的抗體藥物結合物。

在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段包含SEQ ID NO: 7之VH區及SEQ ID NO: 17之VL區。在一些實施例中，本文所述的抗體由SEQ ID NO: 9之重鏈及SEQ ID NO: 19之輕鏈組成。本發明亦提供包含此等抗體或其抗原結合片段的抗體藥物結合物。

在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段為與由SEQ ID NO: 9之重鏈及SEQ ID NO: 19之輕鏈組成之抗體交叉競爭結合至人類FGFR2及FGFR4的抗體或抗原片段。本發明亦提供包含此等抗體或其抗原結合片段的抗體藥物結合物。

在一些實施例中，與由SEQ ID NO: 9之重鏈及SEQ ID NO: 19之輕鏈組成的抗體相比，本文所述的抗體或抗原結合片段具有增強的ADCC活性。在一些實施例中，與由SEQ ID NO: 9之重鏈及SEQ ID NO: 19之輕鏈組成的抗體相比，本文所述的抗體或抗原結合片段不具有增強的ADCC活性。本發明亦提供包含此等抗體或其抗原結合片段的抗體藥物結合物。

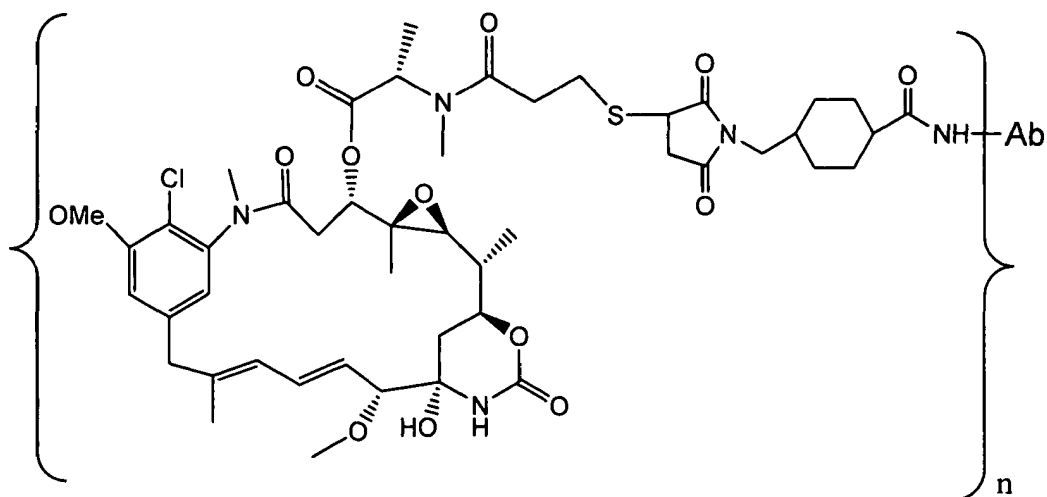
在一些實施例中，本文所述的抗體為人類或人類化抗體。在一些實施例中，本文所述的抗體為單株抗體。在一些實施例中，本文所述的抗體為單株人類或人類化抗體。

在一些實施例中，本發明提供包含本文所述抗體或抗原結合片段及藥物部分的抗體藥物結合物，其中藥物部分經由連接子連接至抗體或抗原結合片段，且其中該連接子係選自由以下組成之群：可分裂連接子、不可分裂連接子、親水性連接子、預帶電型連接子及基於二羧酸之連接子。在一些實施例中，連接子衍生自選自由以下組成之群

的交聯試劑：3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)、4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(sulfo-SPDB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)。在一個特定實施例中，連接子衍生自交聯試劑4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)。

在一些實施例中，本發明提供包含本文所述抗體或抗原結合片段及藥物部分的抗體藥物結合物，其中該藥物部分係選自由以下組成之群：V-ATP酶抑制劑、促細胞凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧利斯他汀(auristatin)、海兔毒素(dolastatin)、類美登素(maytansinoid)、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、蛋白質CRM1之核輸出抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損壞劑、DNA烷基化劑、DNA插入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。在一特定實施例中，本發明抗體藥物結合物之藥物部分為類美登素。在另一個特定實施例中，本發明抗體藥物結合物之藥物部分為N(2')-去乙醯基-N(2')-(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素(DM1)或N(2')-去乙醯基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)。

在一個實施例中，本發明提供具有下式之抗體藥物結合物：



其中Ab為抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 1之重鏈CDR1、SEQ ID NO: 2之重鏈CDR2、SEQ ID NO: 3之重鏈CDR3及SEQ ID NO: 11之輕鏈CDR1、SEQ ID NO: 12之輕鏈CDR2、SEQ ID NO: 13之輕鏈CDR3，其中CDR係根據Kabat定義加以定義，且n為1至10；或其醫藥學上可接受之鹽。在一特定實施例中，n為3或4。在一個實施例中，Ab為包含SEQ ID NO: 7之VH區及SEQ ID NO: 17之VL區的抗體。在另一個實施例中，Ab為由SEQ ID NO: 9之重鏈及SEQ ID NO: 19之輕鏈組成的抗體。

本發明亦提供包含本文所述抗體藥物結合物及醫藥學上可接受之載劑的藥物組合物。在一些實施例中，本發明之藥物組合物係以凍乾物形式製備。在一些實施例中，凍乾物包含本文所述抗體藥物結合物、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20。

本發明提供治療有需要之患者之FGFR2陽性或FGFR4陽性癌症的方法，包含向該患者投與本文所述的抗體藥物結合物或藥物組合物。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：胃癌、乳癌、橫紋肌肉瘤、肝癌、腎上腺癌、肺癌、食道癌、結腸癌及子宮內膜癌。在某些實施例中，癌症係選自腺泡狀橫紋肌肉瘤及胚胎性橫紋肌肉瘤。在一些實施例中，本文所述的治療方法進一步包含向該患者投與酪胺酸

激酶抑制劑、IAP抑制劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑或另一種FGFR2抑制劑。在一特定實施例中，治療方法包含向有需要之患者投與本文所述之抗體藥物結合物與3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲或其醫藥學上可接受之鹽(例如其磷酸鹽)之組合。在某些態樣中，本發明亦提供治療對其他酪胺酸激酶抑制劑(包括(但不限於) EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制劑、IGFR抑制劑及Met抑制劑)具有抗藥性之癌症的方法。

本發明進一步提供用作藥劑的本文所述抗體藥物結合物。本發明提供用於治療FGFR2陽性或FGFR4陽性癌症的抗體藥物結合物或藥物組合物。本發明提供用於治療抗藥性癌症(例如對其他酪胺酸激酶抑制劑具有抗藥性的癌症)的抗體藥物結合物或藥物組合物，包括(但不限於) EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制劑、IGFR抑制劑及Met抑制劑。

在一些實施例中，本文所述的抗體或抗原結合片段為單鏈抗體(scFv)。

本發明亦提供編碼本文所述抗體或抗原結合片段的核酸。在一些實施例中，本發明提供編碼抗體或抗原結合片段(如表1中所述者)的核酸。本發明進一步提供包含本文所述核酸的載體，及包含此等載體的宿主細胞。

本發明提供製備抗體或抗原結合片段的方法，包含培養本文所述宿主細胞及自培養物中回收抗體。

在一個實施例中，本發明提供一種製備抗FGFR2及抗FGFR4抗體藥物結合物的方法，包含：(a)使SMCC與藥物部分DM-1化學連接；(b)使該連接子-藥物與自細胞培養物中回收之抗體結合；及(c)純化該抗體藥物結合物。在一些實施例中，根據該方法製得的抗體藥物結合物具有約3.5之平均DAR，如UV光譜儀所量測。

本發明亦提供包含經標記之本文所述抗體或抗原結合片段或本文所述抗體藥物結合物的診斷試劑。在一些實施例中，標記係選自由以下組成之群：放射性標記、螢光團、發色團、成像劑及金屬離子。

定義

除非另有說明，否則如本文所用之以下術語及片語意欲具有以下含義：

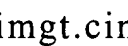
術語「烷基」係指具有指定數目個碳原子的單價飽和烴鏈。舉例而言， C_{1-6} 烷基係指具有1至6個碳原子的烷基。烷基可為直鏈或分支鏈。代表性分支鏈烷基具有一、兩或三個分支鏈。烷基之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基(包括正丙基及異丙基)、丁基(正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基)、戊基(正戊基、異戊基及新戊基)及己基。

如本文所用之術語「抗體」係指免疫球蛋白家族之多肽，其能夠非共價地、可逆地且以特定方式結合相應抗原。舉例而言，天然存在之IgG抗體為包含經二硫鍵互連之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈的四聚體。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域：CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域CL。VH及VL區可進一步細分成高變區(稱為互補決定區(CDR))，此等超變區散置於更保守的區域(稱為構架區(FR))中。各VH及VL由3個CDR及4個FR組成，此等CDR及FR自胺基末端至羧基末端依以下次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用的結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白結合至宿主組織或因子，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)。

術語「抗體」包括(但不限於)單株抗體、人類抗體、人類化抗

體、嵌合抗體及抗個體基因型(抗Id)抗體(包括例如抗Id抗體至本發明抗體)。抗體可具有任何同型/類別(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)或子類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

「互補決定域」或「互補決定區(「CDR」)」可互換地指VL及VH之高變區。CDR為抗體鏈之目標蛋白質結合位點，該位點對於此目標蛋白質具有特異性。人類各VL或VH中存在三個CDR (CDR1-3，自N末端依序編號)，在可變域中佔約15-20%。CDR在結構上與目標蛋白質之抗原決定基互補且因此直接引起結合特異性。VL或VH之剩餘鏈段(所謂的構架區)在胺基酸序列方面展現較小的變異(Kuby, Immunology, 第4版, 第4章, W.H. Freeman & Co., New York, 2000)。

CDR及構架區之位置可利用此項技術中熟知的各種定義來確定，例如Kabat、Chothia、國際免疫遺傳學資料庫(IMGt) (全球資訊網)及AbM (參見例如Johnson等人, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001)；Chothia及Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)；Chothia等人, Nature, 342:877-883 (1989)；Chothia等人, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992)；Al-Lazikani等人, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997))。抗原結合位點之定義亦描述於以下文獻中：Ruiz等人, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000)；及Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001)；MacCallum等人, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)；及Martin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989)；Martin等人, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991)；及Rees等人, Sternberg M.J.E. (編), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

輕鏈與重鏈均分為結構區及功能同源區。術語「恆定」及「可變」係以功能使用。就此而言，應瞭解輕鏈(VL)與重鏈(VH)部分之可變域決定抗原識別及特異性。反之，輕鏈(CL)及重鏈(CH1、CH2或

CH3)之恆定域賦予重要的生物特性，諸如分泌、經胎盤遷移、Fc受體結合、補體結合及其類似特性。恆定區結構域之編號習知隨著其遠離抗體之抗原結合位點或胺基末端而增大。可變區位於N末端且恆定區位於C末端；CH3及CL域實際上分別包含重鏈及輕鏈之羧基末端域。

如本文所用，術語「抗原結合片段」係指抗體之一或多個部分，該等部分保持與抗原之抗原決定基特異性相互作用(例如結合、空間位阻、穩定化/去穩定、空間分佈)的能力。結合片段之實例包括(但不限於)單鏈Fvs (scFv)、駱駝科抗體、經二硫鍵連接之Fv (sdFv)、Fab片段、F(ab')片段；由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；F(ab)2片段；包含兩個在鉸鏈區經二硫橋連接之Fab片段的二價片段；由VH及CH1域組成之Fd片段；由抗體單臂之VL及VH域組成之Fv片段；dAb片段(Ward等人, *Nature* 341:544-546, 1989)，其由VH域組成；及經分離的互補決定區(CDR)，或抗體之其他抗原決定基結合片段。

此外，儘管Fv片段之兩個域(VL及VH)由各別基因編碼，但其可使用重組方法、經合成連接子連接，合成連接子能夠使其以單一蛋白質鏈形式產生，其中VL與VH區配對而形成單價分子(稱為單鏈Fv (scFv))；參見例如Bird等人, *Science* 242:423-426, 1988；及Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883, 1988)。此單鏈抗體亦希望涵蓋於術語「抗原結合片段」範圍內。此等抗原結合片段係使用熟習此項技術者已知的習知技術獲得，且片段係以與完整抗體相同之方式來篩檢其效用。

抗原結合片段亦可併入單域抗體、最大抗體、微型抗體、奈米抗體、胞內抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、v-NAR及雙scFv (參見例如Hollinger及Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-

1136, 2005)。抗原結合片段可移植入基於多肽的支架蛋白中，諸如III型纖維結合蛋白(Fn3) (參見描述纖維結合蛋白多肽單株抗體的美國專利第6,703,199號)。

抗原結合片段可併入包含一對串聯Fv區段(VH-CH1-VH-CH1)的單鏈分子內，該對串聯Fv區段與互補的輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區(Zapata等人, Protein Eng. 8:1057-1062, 1995；及美國專利第5,641,870號)。

如本文所用，術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指具有實質上一致性胺基酸序列或來源於相同遺傳源的多肽，包括抗體及抗原結合片段。此術語亦包括具有單一分子組成之抗體分子之製劑。單株抗體組合物對於特定抗原決定基顯示單一結合特異性及親和力。


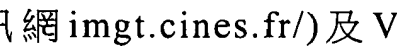
如本文所用，術語「人類抗體」包括可變區中構架區與CDR區均來源於人類起源序列的抗體。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦來源於此等人類序列，例如人類生殖系序列，或人類生殖系序列之突變型式，或含有由人類構架序列分析所產生之共同構架序列的抗體，例如Knappik等人, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000中所述。

本發明之人類抗體可包括不由人類序列編碼的胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入的突變，或促進穩定性或製造的保守性取代)。

如本文所用之術語「親和力」係指抗體與抗原在單一抗原性位點發生相互作用的強度。在各抗原性位點內，抗體「臂」之可變區與抗原在許多位點經由弱的非共價力發生相互作用；相互作用愈大，親和力愈強。

術語「分離抗體」係指一種抗體，其實質上不含具有不同抗原性特異性的其他抗體。然而，特異性結合至一種抗原的分離抗體可具有與其他抗原的交叉反應性。此外，分離抗體可實質上不含其他細胞

物質及/或化學物質。

術語「相應人類生殖系序列」係指編碼人類可變區胺基酸序列或子序列的核酸序列，與人類生殖系免疫球蛋白可變區序列所編碼的所有其他已知可變區相比，該人類可變區胺基酸序列或子序列與參考可變區胺基酸序列或子序列共有的胺基酸序列一致性經測定為最高。相應人類生殖系序列亦可指，與所有其他所評估可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高胺基酸序列一致性的人類可變區胺基酸序列或子序列。相應人類生殖系序列可為單獨構架區、單獨互補決定區、構架區與互補決定區、可變區段(如上文定義)，或包含可變區之序列或子序列的其他組合。序列一致性可使用本文所述方法測定，例如使用BLAST、ALIGN或此項技術中已知的另一種比對算法比對兩個序列。相應人類生殖系核酸或胺基酸序列可與參考可變區核酸或胺基酸序列具有至少約90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。相應人類生殖系序列可經由例如可公開獲得的國際免疫遺傳學資料庫(IMG) (全球資訊網)及V-base (全球資訊網)測定。

片語「特異性結合」或「選擇性結合」當在描述抗原(例如蛋白質)與抗體、抗體片段或抗體源結合劑相互作用之上下文中使用時，係指一種結合反應，其由非均質蛋白質群體及其他生物製品(例如生物樣品，例如血液、血清、血漿或組織樣品)中抗原之存在決定。因此，在某些指定的免疫分析條件下，具有特定結合特異性之抗體或結合劑與特定抗原的結合為背景之至少兩倍且實質上不以顯著量結合至樣品中存在之其他抗原。在一個實施例中，在指定的免疫分析條件下，具有特定結合特異性之抗體或結合劑與特定抗原的結合為背景之至少十(10)倍且實質上不以顯著量結合至樣品中存在之其他抗原。在

此等條件下特異性結合至抗體或結合劑需要根據針對特定蛋白質的特異性來選擇抗體或藥劑。需要或適當時，此選擇可藉由將與來自其他物種(例如小鼠或大鼠)或其他亞型的分子交叉反應的抗體去除來達成。或者，在一些實施例中，選擇與某些所要分子交叉反應的抗體或抗體片段。

術語「特異性結合」當在描述抗原決定基與抗體、抗體片段或抗體衍生結合劑之間相互作用的上下文中使用時，係指抗體或其抗原結合片段找尋其抗原決定基且與其抗原決定基相互作用(例如結合)，不論彼抗原決定基為線性或構形抗原決定基。術語「抗原決定基」係指抗原上之供本發明之抗體或抗原結合片段特異性結合的位點。抗原決定基可由連續胺基酸或因蛋白質之三級摺疊而毗鄰之非連續胺基酸形成。由連續胺基酸形成之抗原決定基在暴露於變性溶劑時典型地得以保持，而由三級摺疊形成之抗原決定基在用變性溶劑處理時典型地喪失。抗原決定基典型地包括呈獨特空間構形之至少3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個或15個胺基酸。測定抗原決定基之空間構形的方法包括此項技術中之技術，例如x射線結晶學及二維核磁共振(參見例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷, G. E. Morris編 (1996))。

多種免疫分析形式可用於選擇對特定蛋白質具特異性免疫反應性的抗體。舉例而言，固相ELISA免疫分析通常用於選擇對蛋白質具有特異性免疫反應性的抗體(關於可用於測定特異性免疫反應性之免疫分析形式及條件的描述，參見例如Harlow及Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998))。特異性或選擇性結合反應產生的信號典型地為背景信號至少兩倍且更典型地為背景至少10至100倍。

術語「平衡解離常數(KD , M)」係指解離速率常數(k_d , 時間 $^{-1}$)除以結合速率常數(k_a , 時間 $^{-1}$, M $^{-1}$)。平衡解離常數可利用此項技

術中已知的任何方法量測。本發明之抗體一般將具有小於約 10^{-7} 或 10^{-8} M (例如小於約 10^{-9} M或 10^{-10} M)之平衡解離常數，在一些實施例中具有小於約 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M之平衡解離常數。

術語「生物可用性」係指投與患者一定量藥物的全身可用性(亦即血液/血漿含量)。生物可用性為指示藥物自所投與劑型到達體循環(general circulation)之時間(速率)與總量(程度)之量度的絕對術語。

如本文所用，片語「實質上由...組成」係指方法或組合物中包括一類或多種活性醫藥劑，以及對於方法或組合物之指定目的而言不具活性的任何賦形劑。在一些實施例中，片語「實質上由...組成」明確排除除本發明抗體藥物結合物之外之一或多種其他活性劑之包涵。在一些實施例中，片語「實質上由...組成」明確排除除本發明抗體藥物結合物與第二共投藥劑之外之一或多種其他活性劑之包涵。

術語「胺基酸」係指天然存在、合成及非天然之胺基酸，以及以類似於天然存在之胺基酸的方式起作用之胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然存在之胺基酸為由遺傳密碼子編碼之胺基酸，以及後來經修飾之彼等胺基酸，例如羧脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸及O-磷絲胺酸。胺基酸類似物係指具有與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構(亦即與氫、羧基、胺基及R基團結合之 α 碳)的化合物，例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基銻。該等類似物具有經修飾之R基團(例如正白胺酸)或經修飾之肽骨架，但保持與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構。胺基酸模擬物係指具有不同於胺基酸之一般化學結構之結構、但以類似於天然存在之胺基酸之方式起作用的化合物。

術語「保守修飾型變異體」適用於胺基酸與核酸序列。相對於特定核酸序列，保守修飾型變異體係指編碼一致或實質上一致胺基酸序列之彼等核酸，或其中核酸不按照實質上一致序列來編碼胺基酸序

列。由於遺傳密碼之簡併，大量在功能上一致之核酸編碼任何指定蛋白質。舉例而言，密碼子GCA、GCC、GCG及GCU皆編碼胺基酸丙胺酸。因此，在其中丙胺酸以密碼子說明之每個位置上，密碼子可改變為任何所述相應密碼子而所編碼多肽不改變。該等核酸變異為「靜默變異」，其為一種保守修飾型變異。本文中編碼多肽之每個核酸序列亦描述每種可能的核酸靜默變異。熟習此項技術者將認識到核酸中之各密碼子(除通常為甲硫胺酸之唯一密碼子之AUG及通常為色胺酸之唯一密碼子之TGG之外)可經修飾而產生在功能上一致之分子。因此，所述各序列中蘊含編碼多肽之核酸之各靜默變異。

對於多肽序列而言，「保守修飾型變異體」包括多肽序列之個別取代、缺失或添加，從而使胺基酸被化學上相似的胺基酸取代。提供在功能上相似胺基酸的保守性取代表在此項技術中已熟知。此等保守修飾型變異體亦包括且不排除本發明之多形性變異體、種間同源物及對偶基因。以下八種基團含有彼此間為保守性取代之胺基酸：1)丙胺酸(A)，甘胺酸(G)；2)天冬胺酸(D)，麩胺酸(E)；3)天冬醯胺酸(N)，麩醯胺酸(Q)；4)精胺酸(R)，離胺酸(K)；5)異白胺酸(I)，白胺酸(L)，甲硫胺酸(M)，纈胺酸(V)；6)苯丙胺酸(F)，酪胺酸(Y)，色胺酸(W)；7)絲胺酸(S)，蘇胺酸(T)；及8)半胱胺酸(C)，甲硫胺酸(M) (參見例如Creighton, *Proteins* (1984))。在一些實施例中，術語「保守型序列修飾」用於指不顯著地影響或改變含有胺基酸序列之抗體之結合特徵的胺基酸修飾。

如本文所用，術語「最佳化」係指已改變而可使用密碼子編碼胺基酸序列的核苷酸序列，該等密碼子較佳存在於生產細胞或生物體中，一般為真核細胞，例如酵母細胞、畢赤氏酵母細胞(*Pichia cell*)、真菌細胞、木黴屬細胞(*Trichoderma cell*)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)或人類細胞。最佳化核苷酸序列係經工程化而使最初由起始核苷酸序

列編碼之胺基酸序列得到完全或儘可能多的保持，起始核苷酸序列亦稱為「親本」序列。

在兩個或兩個以上核酸或多肽序列之上下文中，術語「一致性百分比」係指兩個或兩個以上序列或子序列相同的程度。兩個序列若在所比較之區域上具有相同的胺基酸或核苷酸序列，則為「一致」的。當在比較窗或指定區域上根據最大一致性進行比較及比對(如使用以下序列比較算法之一或藉由人工比對及目測檢查所量測)時，若兩個序列具有指定百分比之相同胺基酸殘基或核苷酸(亦即在指定區域上或若未指定則在整個序列上具有60%一致性，視情況為65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致性)，則兩個序列為「實質上一致」。一致性視情況存在於長度為至少約30個核苷酸(或10個胺基酸)之區域上，或更佳存在於長度為100至500或1000或多於1000個核苷酸(或20、50、200或多於200個胺基酸)之區域上。

進行序列比較時，典型地，一個序列充當參考序列，相對於該參考序列比較測試序列。使用序列比較算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦，必要時指定子序列座標，且指定序列算法程式參數。可使用預設程式參數，或可指定替代參數。序列比較算法接著根據程式參數計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

如本文所用之「比較窗」包括提及一段選自由20至600、通常約50至約200、更通常約100至約150組成之群的任一連續位置數目，其中一序列與具有相同連續位置數目之參考序列經最佳比對之後，可對該兩個序列進行比較。用於比較的序列比對方法在此項技術中已熟知。用於比較之最佳序列比對可藉由以下方式進行：例如局部同源算法，Smith及Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c (1970)；同源性比對算法，Needleman及Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)；相似性搜尋方法，Pearson及Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)；此

等算法之電腦化實現方式(GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA，Wisconsin Genetics套裝軟體，Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI)；或人工比對及目測檢查(參見例如Brent等人，Current Protocols in Molecular Biology, 2003)。

適於測定序列一致性及序列相似性百分比的兩個算法實例為BLAST及BLAST 2.0算法，其分別描述於Altschul等人，Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977；及Altschul等人，J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990中。執行BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)公開獲得。此算法包括首先藉由鑑別查詢序列中長度W之短字來鑑別高分序列對(HSP)，其與資料庫序列中相同長度字比對時匹配或滿足一些得正值的臨限分數T。T稱為鄰近字分數臨限值(Altschul等人，前述)。此等初始鄰近字匹配充當起始搜尋之種子以發現含有其之更長HSP。沿各序列雙向擴展字匹配，只要累積比對分數增加。對於核苷酸序列而言，使用參數M(一對匹配殘基之獎勵分數；始終>0)及N(失配殘基之懲罰分數；始終<0)計算累積分數。對於胺基酸序列而言，使用計分矩陣計算累積分數。在以下情況下中止擴展各方向上之字匹配：累積比對分數自其所達成之最大值降低量X；累積分數因一或多個負分殘基比對之累積而變成零或零以下；或達到任一序列之末端。BLAST算法參數W、T及X決定比對之敏感度及速度。BLASTN程式(對於核苷酸序列)使用字長(W) 11、期望值(E) 10、M = 5、N = -4及雙股比較作為預設值。對於胺基酸序列而言，BLASTP程式使用字長3及期望值(E) 10作為預設值，且BLOSUM62計分矩陣(參見Henikoff及Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915)使用比對(B) 50、期望值(E) 10、M = 5、N = -4及雙股比較。

BLAST算法亦執行兩個序列之間相似性的統計分析(參見例如

Karlin及Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993)。
BLAST算法提供之一個相似性度量為最小和機率($P(N)$)，其指示兩個核苷酸或胺基酸序列之間將偶然發生匹配的機率。舉例而言，若測試核酸與參考核酸比較時，最小和機率小於約0.2，更佳小於約0.01，且最佳小於約0.001，則認為核酸與參考序列相似。

兩個胺基酸序列之間的一致性百分比亦可使用E. Meyers及W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17, 1988)之算法(該算法已併入ALIGN程式(2.0版))、使用PAM120權重殘基表、空隙長度罰分12及空隙罰分4來確定。另外，兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用已併入GCG套裝軟體(可於www.gcg.com獲得)之GAP程式中的Needleman及Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970)算法、使用Blossom 62矩陣或PAM250矩陣，以及空隙權數16、14、12、10、8、6或4及長度權數1、2、3、4、5或6來確定。

除上文指出之序列一致性百分比以外，兩個核酸序列或多肽實質上一致之另一指征為第一核酸所編碼之多肽與針對第二核酸所編碼之多肽而產生的抗體具有免疫交叉反應性，如下文所述。因此，一多肽典型地與第二多肽實質上一致，例如在兩個肽不同之處僅為保守性取代的情況下。兩個核酸序列實質上一致的另一指征為兩個分子或其補體在嚴格條件下彼此雜交，如下文所述。兩個核酸序列實質上一致的另一指征為可使用相同引子來擴增序列。

術語「核酸」在本文中與術語「聚核苷酸」可互換地使用且係指呈單股或雙股形式之脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。該術語包涵含有已知核苷酸類似物或經修飾之骨架殘基或鍵聯的核酸，該等核酸為合成、天然存在及非天然存在之核酸，其具有與參考核酸相似之結合特性且其以類似於參考核苷酸的方式代謝。該等類似物之實例包括(但不限於)硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、對掌性膦

酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

除非另外說明，否則特定核酸序列亦隱含地包涵其保守修飾型變異體(例如簡併密碼子取代)及互補序列以及明確指定之序列。特定而言，如下文詳述，簡併密碼子取代可藉由產生其中第三位置上之一或多個所選(或所有)密碼子經混合鹼基及/或脫氧肌苷殘基取代之序列來達成(Batzer等人, (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka等人, (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; 及Rossolini等人, (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98)。

在核酸之上下文中，術語「可操作地連接」係指兩個或兩個以上聚核苷酸(例如DNA)區段之間的功能關係。典型地，其係指轉錄調節序列與所轉錄序列的功能關係。舉例而言，若啟動子或增強子序列於適當宿主細胞或其他表現系統中刺激或調節編碼序列之轉錄，則啟動子或增強子序列可操作地連接至編碼序列。一般而言，可操作地連接至所轉錄序列之啟動子轉錄調節序列實體上鄰接至所轉錄序列，亦即其為順式作用。然而，一些轉錄調節序列(諸如增強子)不必實體上鄰接至或緊密接近編碼序列，其增強該編碼序列之轉錄。

術語「多肽」與「蛋白質」在本文中可互換使用且係指胺基酸殘基之聚合物。該等術語適用於其中一或多個胺基酸殘基為相應天然存在之胺基酸之人造化學模擬物的胺基酸聚合物以及適用於天然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。除非另外說明，否則特定多肽序列亦隱含地包涵其保守修飾型變異體。

如本文所用，術語「免疫結合物」或「抗體藥物結合物」或「結合物」係指抗體或其抗原結合片段連接至另一種藥劑，諸如化學治療劑、毒素、免疫治療劑、成像探針及其類似物。此連接可為共價鍵，或非共價相互作用，諸如靜電力。為形成免疫結合物，可使用此項技術中已知的各種連接子。另外，免疫結合物可以融合蛋白形式提

供，此融合蛋白可由編碼免疫結合物的聚核苷酸表現。如本文所用，「融合蛋白」係指經由兩個或兩個以上針對各別蛋白質(包括肽及多肽)編碼之基因或基因片段之連接而產生的蛋白質。融合基因轉譯而產生功能特性來源於各初始蛋白質的單一蛋白質。

術語「鹽」係指化合物(例如作為與本發明之抗體藥物結合物組合投與之另一種治療劑的化合物)之酸加成鹽或鹼加成鹽。「鹽」尤其包括「醫藥學上可接受之鹽」。術語「醫藥學上可接受之鹽」係指保持化合物之生物有效性及特性且典型地在生物學上或其他方面無不良效應之鹽。在許多情況下，化合物由於存在胺基及/或羧基或其類似基團而能夠形成酸式鹽及/或鹼式鹽。

術語「個體」包括人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、犬、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除非提及，否則術語「患者」或「個體」在本文中可互換地使用。

如本文所用，術語「細胞毒素」或「細胞毒性劑」係指對細胞生長及增殖不利且可用於減少、抑制或摧毀細胞或惡性疾病的任何藥劑。

如本文所用，術語「抗癌劑」係指可用於治療細胞增殖性病變(諸如癌症)的任何藥劑，包括(但不限於)細胞毒性劑、化學治療劑、放射療法及放射治療劑、靶向抗癌劑及免疫治療劑。

如本文所用，術語「藥物部分」或「有效負荷」係指與本發明之抗體或抗原結合片段結合的化學部分，且可包括任何治療劑或診斷劑，例如抗癌劑、消炎劑、抗感染劑(例如抗真菌、抗細菌、抗寄生蟲、抗病毒)，或麻醉劑。舉例而言，藥物部分可為抗癌劑，諸如細胞毒素。在某些實施例中，藥物部分係選自V-ATP酶抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧

利斯他汀、海兔毒素、類美登素、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、蛋白質CRM1之核輸出抑制劑、DPPIV抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、蛋白酶體抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損壞劑、DNA烷基化劑、DNA插入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。將此等抑制劑中之每一者連接至與本發明之抗體及方法相容之連接子的方法在此項技術中已知。參見例如 Singh 等人, (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, 第525卷, 445-457。另外, 有效負荷可為生物物理學探針、螢光團、自旋標記、紅外探針、親和力探針、螯合劑、光譜學探針、放射性探測器、脂質分子、聚乙二醇、聚合物、自旋標記、DNA、RNA、蛋白質、肽、表面、抗體、抗體片段、奈米粒子、量子點、脂質體、PLGA粒子、醣類或多醣。

術語「類美登素藥物部分」意謂抗體-藥物結合物之子結構, 其具有類美登素化合物之結構。美登素最先係自東非灌木齒葉美登木 (*Maytenus serrata*) 分離而得(美國專利第3,896,111號)。隨後, 發現某些微生物亦產生類美登素, 諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及美登醇類似物已有報導。參見美國專利第4,137,230號、第4,248,870號、第4,256,746號、第4,260,608號、第4,265,814號、第4,294,757號、第4,307,016號、第4,308,268號、第4,308,269號、第4,309,428號、第4,313,946號、第4,315,929號、第4,317,821號、第4,322,348號、第4,331,598號、第4,361,650號、第4,364,866號、第4,424,219號、第4,450,254號、第4,362,663號, 及第4,371,533號, 及Kawai等人(1984) *Chem. Pharm. Bull.* 3441-3451), 各專利以引用的方式特此併入本文中。適用於結合之特定類美登素之實例包括DM1、DM3及DM4。

「腫瘤」係指贅生性細胞生長及增殖(不論惡性或良性)，及所有癌變前及癌變細胞及組織。

術語「抗腫瘤活性」意謂腫瘤細胞增殖速率、存活力或轉移活性降低。舉例而言，抗腫瘤活性可由以下顯示：治療期間發生之異常細胞生長速率下降，或腫瘤大小穩定或減小，或因治療而存活期比無治療之對照更長。此活性可使用所接受的活體外或活體內腫瘤模型評估，包括(但不限於)異種移植模型、同種異體移植模型、MMTV模型，及此項技術中研究抗腫瘤活性的其他已知模型。

術語「惡性疾病」係指非良性腫瘤或癌症。如本文所用，術語「癌症」包括以細胞生長失調或不可控為特徵的惡性疾病。例示性癌症包括：癌瘤、肉瘤、白血病及淋巴瘤。

術語「癌症」包括原發惡性腫瘤(例如腫瘤細胞尚未遷移至除初始腫瘤部位之外之個體身體部位的腫瘤)及繼發惡性腫瘤(例如因轉移(腫瘤細胞遷移至不同於初始腫瘤部位的第二部位)而發生的腫瘤)。

術語「FGFR2」係指纖維母細胞生長因子受體2，其為受體酪氨酸激酶超家族之一員。FGFR2之核酸及胺基酸序列已知，且已以如下基因庫寄存編號公開：NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、NM_001144918.1、NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2。在結構上，FGFR2胺基酸序列為信號肽已裂解的受體酪氨酸激酶蛋白、至少一個或多個免疫球蛋白(Ig)樣域、酸性盒、跨膜域及分裂酪氨酸激酶域，且在其全部長度內與以下基因庫寄存編號之胺基酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性：NM_000141.4、NM_001144913.1、NM_001144914.1、NM_001144915.1、NM_001144916.1、NM_001144917.1、

NM_001144918.1 、 NM_001144919.1 、 NM_022970.3 、 NM_023029.2。在結構上，FGFR2核酸序列在其全部長度內與以下基因庫寄存編號之核酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性：NM_000141.4、NM_001144913.1 、 NM_001144914.1 、 NM_001144915.1 、 NM_001144916.1 、 NM_001144917.1 、 NM_001144918.1 、 NM_001144919.1、NM_022970.3、NM_023029.2。

術語「FGFR4」係指纖維母細胞生長因子受體4，其為受體酪胺酸激酶超家族之一員。FGFR4之核酸及胺基酸序列已知，且已以如下基因庫寄存編號公開：NM_002011.3 、 NM_022963.2 、 NM_213647.1。在結構上，FGFR4胺基酸序列為信號肽已裂解的受體酪胺酸激酶蛋白、三個免疫球蛋白(Ig)樣域、酸性盒、跨膜域及分裂酪胺酸激酶域，且在其全部長度內與以下基因庫寄存編號之胺基酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性：NM_002011.3 、 NM_022963.2 、 NM_213647.1。在結構上，FGFR4核酸序列在其全部長度內與以下基因庫寄存編號之核酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性：NM_002011.3 、 NM_022963.2、NM_213647.1。

術語「FGFR2/4」在本文中用於指FGFR2及FGFR4。舉例而言，結合FGFR2/4的抗體係指結合FGFR2及FGFR4的抗體。

術語「表現FGFR2之癌症」或「FGFR2陽性癌症」係指癌細胞表面上表現FGFR2或FGFR2突變形式的癌症。術語「表現FGFR4之癌症」或「FGFR4陽性癌症」係指癌細胞表面上表現FGFR4或FGFR4突變形式的癌症。

術語「酪胺酸激酶抗性癌症」或「酪胺酸激酶抗性腫瘤」係指

(1)初始對標準照護酪胺酸激酶療法無反應的癌症或腫瘤，稱為「原發抗藥性」；或(2)初始對標準照護酪胺酸激酶療法有反應且其後進展(如依據舊病變及/或新病變之再次出現所確定)或擴散的癌症或腫瘤，亦稱為「繼發抗藥性」或「復發性癌症」。

術語「Her2抗性癌症」或「Her2抗性腫瘤」係指(1)初始對標準照護Her2療法無反應的癌症或腫瘤，稱為「原發抗藥性」；或(2)初始對標準照護Her2療法有反應且其後進展(如依據舊病變及/或新病變之再次出現所確定)或擴散的癌症或腫瘤，亦稱為「繼發抗藥性」或「復發性癌症」。

如本文所用，在一個實施例中，術語「治療」任何疾病或病症係指改善疾病或病症(亦即減緩或阻滯或減慢疾病或其至少一種臨床症狀之發展)。在另一個實施例中，「治療」係指緩解或改善至少一種身體參數，包括患者可能覺察不到的身體參數。在又一個實施例中，「治療」係指在身體上(例如可覺察症狀之穩定化)、在生理上(例如身體參數之穩定化)或就兩者而言，調節疾病或病症。在又一個實施例中，「治療」係指延遲疾病或病症之發作或發展或進展。

術語「治療上可接受之量」或「治療有效劑量」可互換地係指足以達成所要結果(亦即，減小腫瘤大小、抑制腫瘤生長、防止轉移、抑制或防止病毒、細菌、真菌或寄生蟲感染)的量。在一些實施例中，治療上可接受之量不誘發或產生不良副作用。在一些實施例中，治療上可接受之量誘發或產生副作用，但考慮到患者狀況，此等副作用僅為健康照護提供者可接受之副作用。治療上可接受之量可藉由首先投與低劑量且接著遞增此劑量直至達成所要效果來確定。本發明分子之「預防有效劑量」及「治療有效劑量」分別可為預防疾病症狀(包括癌症相關症狀)之發作或降低疾病症狀(包括癌症相關症狀)之嚴重度。

術語「共投與」係指個體血液中存在兩種活性劑。共投與的活性劑可並行或依序傳遞。

【圖式簡單說明】

圖1顯示一組抗體相對於重組人類FGFR2 IIIb的親和力估算值。

圖2(A)至(B)顯示抗FGFR抗體充當Baf-FGFR2受體系統之促效劑的能力。

圖3(A)至(B)顯示抗FGFR抗體充當Baf-FGFR2受體系統之拮抗劑的能力。

圖4(A)至(B)顯示抗FGFR2-及抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADC在SNU16腫瘤異種移植小鼠模型中的抗腫瘤活性；(C)顯示與SMCC-DM1及SPDB-DM4連接子-有效負荷結合、呈ADC形式之12433抗體的抗腫瘤活性；(D)-(E)顯示抗FGFR2-及抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADC之藥物動力學特性；(F)顯示一組抗FGFR2-及抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADC之抗腫瘤活性與ADC清除率的關係。

圖5(A)至(C)為西方墨點圖，其顯示抗FGFR抗體或ADC調節FGFR信號傳導的能力及FGFR2擴增細胞株SNU16 ((A)為2小時之後，(B)為2-72小時，(C)為Kato-III細胞)中之總受體表現。

圖6(A)至(D)顯示相對於IgG及不含有效負荷之對照組，12425-MCC-DM1抑制SNU-16 (A)、Kato-III (B)或NUGC3 (C)細胞的能力；(D)顯示非結合抗體12425不具有任何明顯的抗增殖作用。

圖7(A)至(B)為12425-MCC-DM1治療之後，SNU-16 (A)或NUGC3 (B)腫瘤異種移植物之影像，其顯示pHH3及所分裂卡斯蛋白酶3表現之評估。

圖8(A)至(F)顯示抗FGFR2-及/或抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADC在NCI-H716 (A)、MFM223 (B)、人類原發胃腫瘤異種移植物(CHGA-010) (C)、人類原發肺腫瘤異種移植物模型(HLUX1228) (D)、人類原

發乳癌異種移植模型(E)及人類原發乳腺管癌異種移植模型(F)中的抗腫瘤活性。

圖9顯示抗FGFR2/4 ADC 12425-MCC-DM1單獨及與FGFR酪胺酸激酶抑制劑BGJ398之組合在CHGA-119腫瘤異種移植模型中的抗腫瘤活性。

圖10顯示不同劑量的抗FGFR2/4 ADC 12425-MCC-DM1在SNU-16腫瘤異種移植小鼠模型中、在不同時程的抗腫瘤活性。

圖11(A)至(C)顯示抗FGFR2抗體活體外誘導Kato III細胞之ADCC (A)、結合至C1q (B)、誘導Kato III細胞之CDC (C)之能力的評估。(D)顯示呈非結合抗體或MCC-DM1結合物ADC形式之ADCC耗乏性變異體在活體內的作用。

圖12(A)至(B)為西方墨點圖，其顯示抗FGFR抗體或ADC調節FGFR信號傳導的能力，及2小時之後(A)或一段時程期間(B)，表現FGFR4之細胞株MDA-MB453中的總受體表現。

圖13(A)至(D)顯示FGFR2或FGFR2/4抗體(非結合形式或MCC-DM1 ADC形式)抑制MDA-MB453 (A)、RH4 (B)、JR細胞(C)或一組癌細胞株(D)的能力。

圖14(A)至(C)為12425-MCC-DM1治療之後，MDA-MB453 ((A)及(B))或RH4 (C)腫瘤異種移植之影像，其顯示pHH3及/或裂解卡爾斯蛋白酶3表現之評估。

圖15(A)至(B)顯示抗FGFR2-及抗FGFR2/4-MCC-DM1 ADC在MDA-MB453 (A)及RH4 (B)腫瘤異種移植小鼠模型中的抗腫瘤活性。

圖16(A)至(D)顯示12425-MCC-DM1在小鼠((A)至(B))、大鼠(C)或食蟹猴(D)中的PK概況。

圖17(A)至(B)顯示12425之工程化變異體(20562-MCC-DM1)在活

體外(A)及活體內(B)抑制SNU-16細胞增殖的能力。

圖18(A)至(B)顯示10164之親和力成熟變異體(20809-MCC-DM1)及12425之親和力成熟變異體(20811-MCC-DM1)在活體外(A)及活體內(B)抑制SNU-16細胞增殖的能力。

圖19顯示FGFR2之氬交換實驗結果。(A)顯示FGFR2在六種治療劑mAb不存在(對照)及存在下的絕對氬吸收量。條形圖之高度為三次量測之平均值且誤差條為一個標準差；(B)顯示mAb結合之FGFR2與對照FGFR2之間在氬吸收量除以量測標準誤差之值上的差異；(C)顯示在FGFR2 IIIc:FGFR2晶體結構(PDB ID: 1EV2)上所繪製之當mAb結合至FGFR2時的高保護區域；且(D)顯示在FGFR2 IIIb:FGFR1晶體結構(PDB ID: 3OJM)上所繪製之當mAb結合至FGFR2時的高保護區域。

圖20顯示X射線結晶學抗原決定基定位研究的結果。(A)顯示結合至FGFR2之12425 Fab的整體結構(左圖)及FGFR2上之與所標記抗原決定基殘基相互作用的詳細表面(右圖)；(B)顯示結合至FGFR4之12425 Fab的整體結構(左圖)及FGFR4上之與所標記抗原決定基殘基相互作用的詳細表面(右圖)；及(C)顯示人類FGFR2與FGFR4在D2域中的序列比對。完全保守性殘基呈深灰色陰影，部分保守性殘基呈淺灰色陰影。虛線方框為接觸12425 Fab之FGFR2殘基，以及其在FGFR4中之所比對對應殘基。

圖21顯示增殖研究結果，其為活體外SNU 16細胞與BGJ398抗性SNU 16細胞對BGJ398或吉非替尼(Gefitinib) ($IC_{50} = 16.7 \text{ nM}$)之敏感性的比較。

【實施方式】

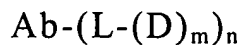
本發明提供結合至FGFR2與FGFR4 (「FGFR2/4」)的抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)，及抗體藥物結合物。詳言之，本發明提供結合至FGFR2/4且在此結合後內化的抗體及抗體片段(例如抗原結合片

段)。本發明之抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)可用於製備抗體藥物結合物。此外，本發明提供具有所要藥物動力學特徵及其他所要特徵的抗體藥物結合物，且從而可用於治療表現FGFR2及/或FGFR4之癌症，諸如胃癌、乳癌、橫紋肌肉瘤(例如腺泡狀橫紋肌肉瘤或胚胎性橫紋肌肉瘤)、肝癌、腎上腺癌、肺癌、結腸癌及子宮內膜癌。本發明進一步提供包含本發明抗體藥物結合物之醫藥組合物，以及製備及使用此等醫藥組合物治療癌症的方法。

抗體藥物結合物

本發明提供抗體藥物結合物，其中特異性結合至FGFR2/4的抗體、抗原結合片段或其功能等效物連接至藥物部分。在一個態樣中，本發明之抗體、抗原結合片段或其功能等效物藉由連接子、經由共價連接方式連接至作為抗癌劑的藥物部分。本發明之抗體藥物結合物可選擇性地將有效劑量之抗癌劑(例如細胞毒性劑)傳遞至表現FGFR2及/或FGFR4之腫瘤組織，藉此達成較大選擇性(及較低有效劑量)。

在一個態樣中，本發明提供式(I)之免疫結合物：



其中Ab表示本文所述之FGFR2/4結合抗體。

L為連接子；

D為藥物部分；

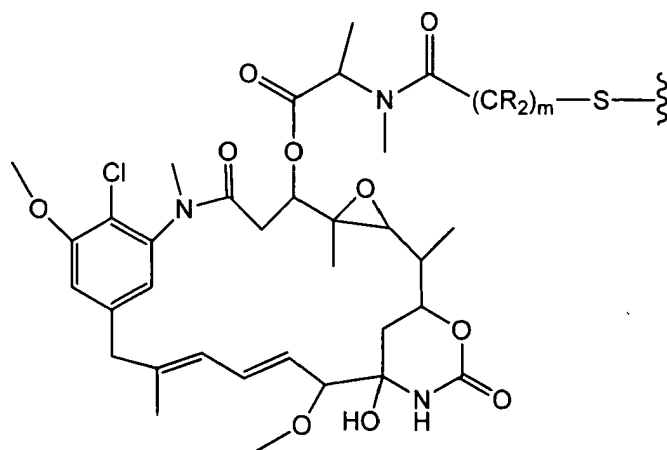
m為整數1至8；及

n為整數1至20。在一個實施例中，n為整數1至10、2至8，或2至5。在一個特定實施例中，n為2、3或4。在一些實施例中，m為1；在其他實施例中，m為2、3或4。

雖然對於特定結合物分子而言，藥物與抗體比率具有確切值(例如對於式(I)，為n乘以m)，但應理解，當用於描述含有許多分子的樣品時，由於存在某些程度的非均質性(典型地與結合步驟有關)，因此

該值經常為平均值。免疫結合物樣品之平均負荷在本文中稱為藥物與抗體比率或「DAR」。在一些實施例中，當藥物為類美登素時，其稱為「MAR」。在一些實施例中，DAR介於約1與約5之間，且典型地為約3、3.5、4、4.5或5。在一些實施例中，樣品中至少50重量%為具有平均值 $DAR \pm 2$ 的化合物，且樣品中至少50%較佳為含有平均值 $DAR \pm 1$ 的結合物。較佳實施例包括其中DAR為約3.5的免疫結合物。在一些實施例中，「約n」之DAR意謂DAR之量測值在n之20%範圍內。

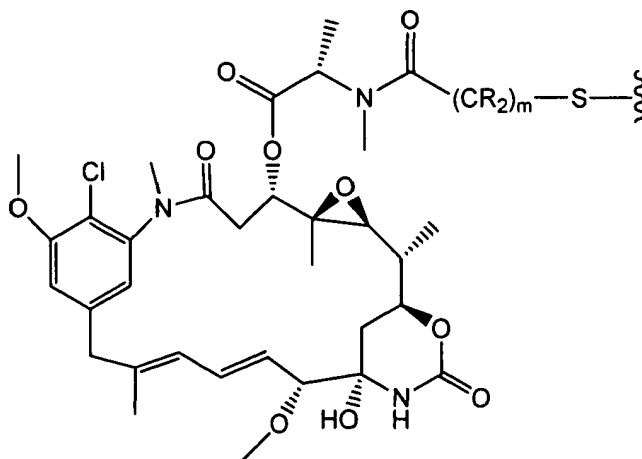
本發明亦關於免疫結合物，其包含連接或結合至藥物部分的如本文揭示之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及其功能等效物。在一個實施例中，藥物部分D為類美登素藥物部分，包括具有以下結構之彼等物：



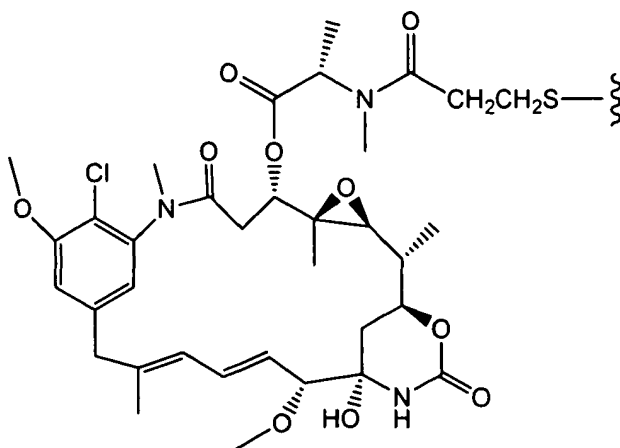
其中波形線指示類美登素之硫原子共價連接至抗體藥物結合物之連接子。R在每次出現時獨立地為H或 C_1 - C_6 烷基。使醯胺基與硫原子連接的伸烷基鏈可為甲基、乙基或丙基，亦即m為1、2或3。(美國專利第633,410號；美國專利第5,208,020號；Chari等人 (1992) *Cancer Res.* 52:127-131；Lui等人 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8618-8623)。

本發明之免疫結合物涵蓋類美登素藥物部分之所有立體異構體，亦即在類美登素之對掌性碳處呈R組態與S組態之任何組合。在

一個實施例中，類美登素藥物部分具有以下立體化學結構。

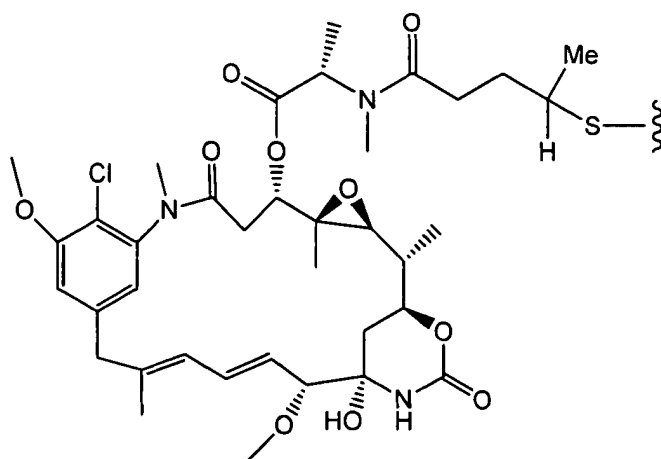


在一個實施例中，類美登素藥物部分為N^{2'}-去乙醯基-N^{2'}-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素(亦稱為DM1)。DM1由以下結構式表示。



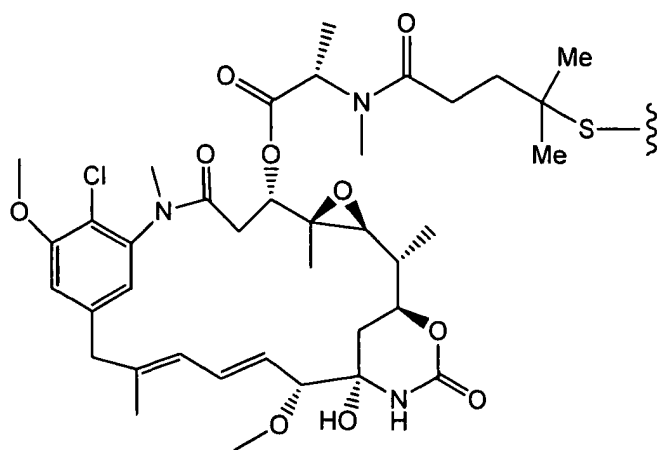
DM 1

在另一個實施例中，類美登素藥物部分為N^{2'}-去乙醯基-N^{2'}-(4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素(亦稱為DM3)。DM3由以下結構式表示。



DM3

在另一個實施例中，類美登素藥物部分為 $N^{2'}$ -去乙醯基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素(亦稱為DM4)。DM4由以下結構式表示。



DM4

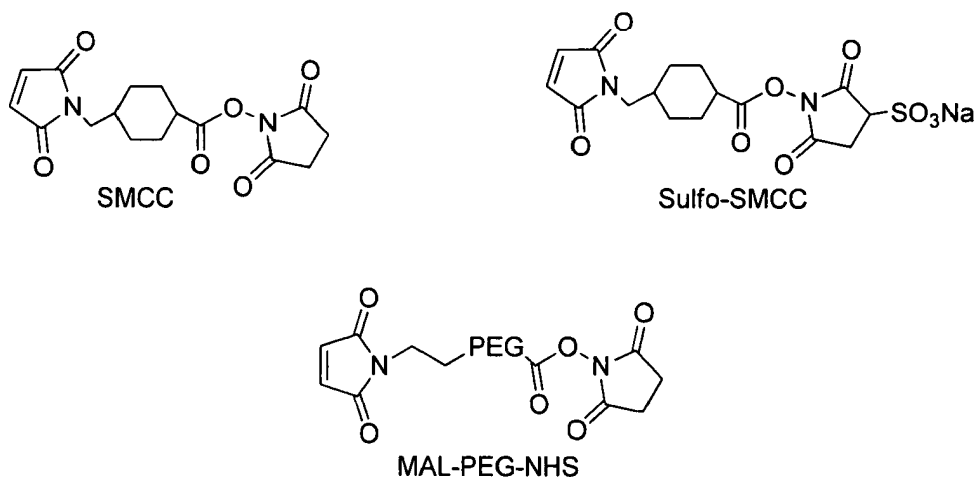
藥物部分D可經由連接子L連接至抗體Ab。L為能夠使藥物部分經由共價鍵連接至抗體的任何化學部分。交聯試劑為雙官能或多官能試劑，其可用於使藥物部分與抗體連接而形成抗體藥物結合物。抗體藥物結合物可使用交聯試劑製備，該交聯試劑具有能夠結合至藥物部分與抗體的反應性官能基。舉例而言，半胱胺酸、硫醇或胺(例如N末端或胺基酸側鏈，諸如抗體之離胺酸)可與交聯試劑之官能基形成鍵。

在一個實施例中，L為可分裂連接子。在另一個實施例中，L為

不可分裂連接子。在一些實施例中，L為酸不穩定性連接子、光不穩定性連接子、肽酶可分裂連接子、酯酶可分裂連接子、二硫鍵可分裂連接子、親水性連接子、預帶電型連接子，或基於二羧酸之連接子。

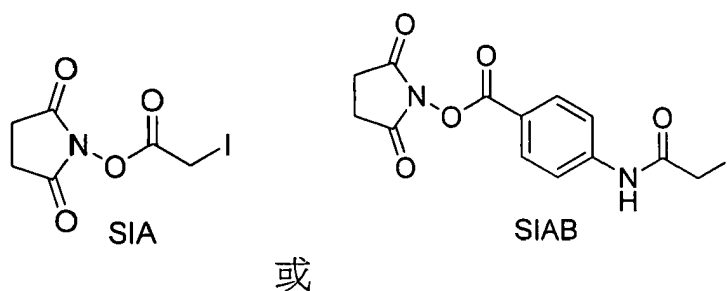
在藥物部分(例如類美登素)與抗體之間形成不可分裂連接子的適合交聯試劑在此項技術中已熟知，且該等交聯試劑可形成包含硫原子的不可分裂連接子(諸如SMCC)或不含硫原子的彼等物。在藥物部分(例如類美登素)與抗體之間形成不可分裂連接子的較佳交聯試劑包含基於順丁烯二醯亞胺基或基於鹵乙醯基之部分。根據本發明，此等不可分裂連接子據稱衍生自基於順丁烯二醯亞胺基或基於鹵乙醯基之部分。

包含基於順丁烯二醯亞胺基之部分的交聯試劑包括(但不限於) 4-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸N-丁二醯亞胺酯)(其為SMCC之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、 κ -順丁烯二醯亞胺基十一烷酸N-丁二醯亞胺酯(KMUA)、 γ -順丁烯二醯亞胺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(GMBS)、 ϵ -順丁烯二醯亞胺基己酸N-羥基丁二醯亞胺酯(EMCS)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯(MBS)、N-(α -順丁烯二醯亞胺基乙醯氧基)-丁二醯亞胺酯(AMSA)、6-(β -順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸丁二醯亞胺酯(SMPH)、4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SMPB)、N-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)異氰酸酯(PMIP)及含有聚乙二醇間隔子之基於順丁烯二醯亞胺基之交聯試劑，諸如MAL-PEG-NHS。此等交聯試劑形成衍生自基於順丁烯二醯亞胺基之部分的不可分裂連接子。基於順丁烯二醯亞胺基之交聯試劑的代表性結構顯示如下。



在另一個實施例中，連接子L衍生自4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)或MAL-PEG-NHS。

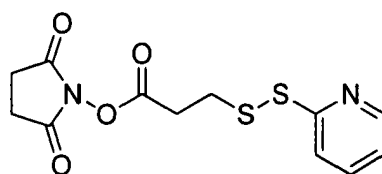
包含基於鹵乙醯基之部分的交聯試劑包括碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、溴乙酸N-丁二醯亞胺酯(SBA)及3-(溴乙醯胺基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SBAP)。此等交聯試劑形成衍生自基於鹵乙醯基之部分的不可分裂連接子。基於鹵乙醯基之交聯試劑的代表性結構顯示如下。



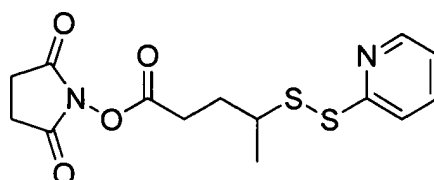
在一個實施例中，連接子L衍生自碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)或(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)。

在藥物部分(例如類美登素)與抗體之間形成可分裂連接子的適合交聯試劑在此項技術中已熟知。含二硫化物連接子為經由二硫化物交換可分裂的連接子，二硫化物交換可在生理條件下發生。根據本發明，此等可分裂連接子據稱衍生自基於二硫化物的部分。適合二硫化

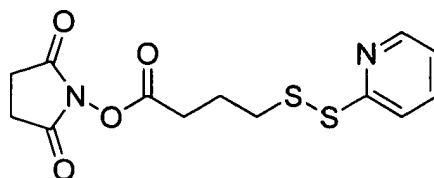
物交聯試劑包括3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)及4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(sulfo-SPDB)，其結構顯示如下。此等二硫化物交聯試劑形成衍生自基於二硫化物之部分的不可分裂連接子。



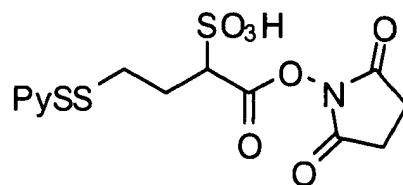
3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)，



4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)，



4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)，及

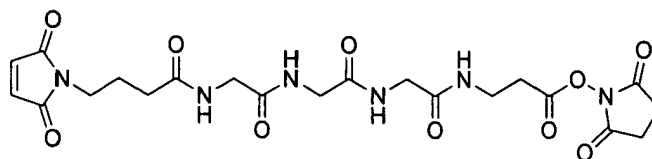


4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(sulfo-SPDB)。

在一個實施例中，連接子L衍生自4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)。

在藥物部分(例如類美登素)與抗體之間形成帶電荷連接子的適合

交聯試劑稱為預帶電型交聯試劑。在一個實施例中，連接子L衍生自預帶電型交聯試劑CX1-1。CX1-1之結構如下。

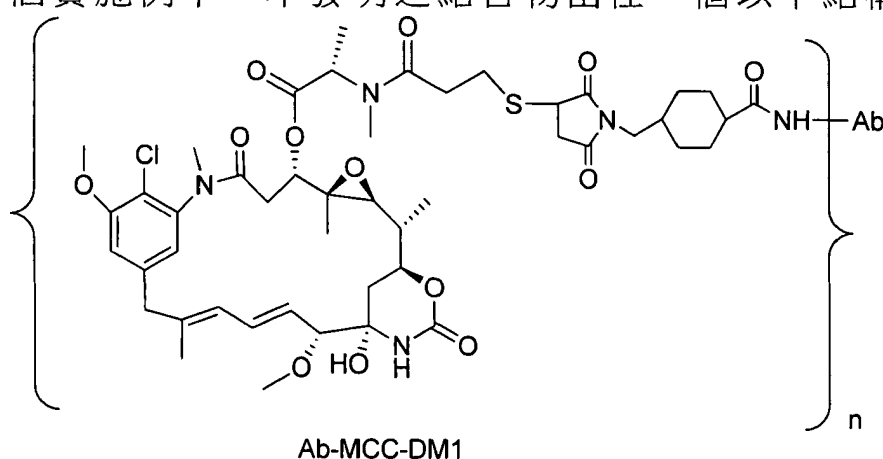


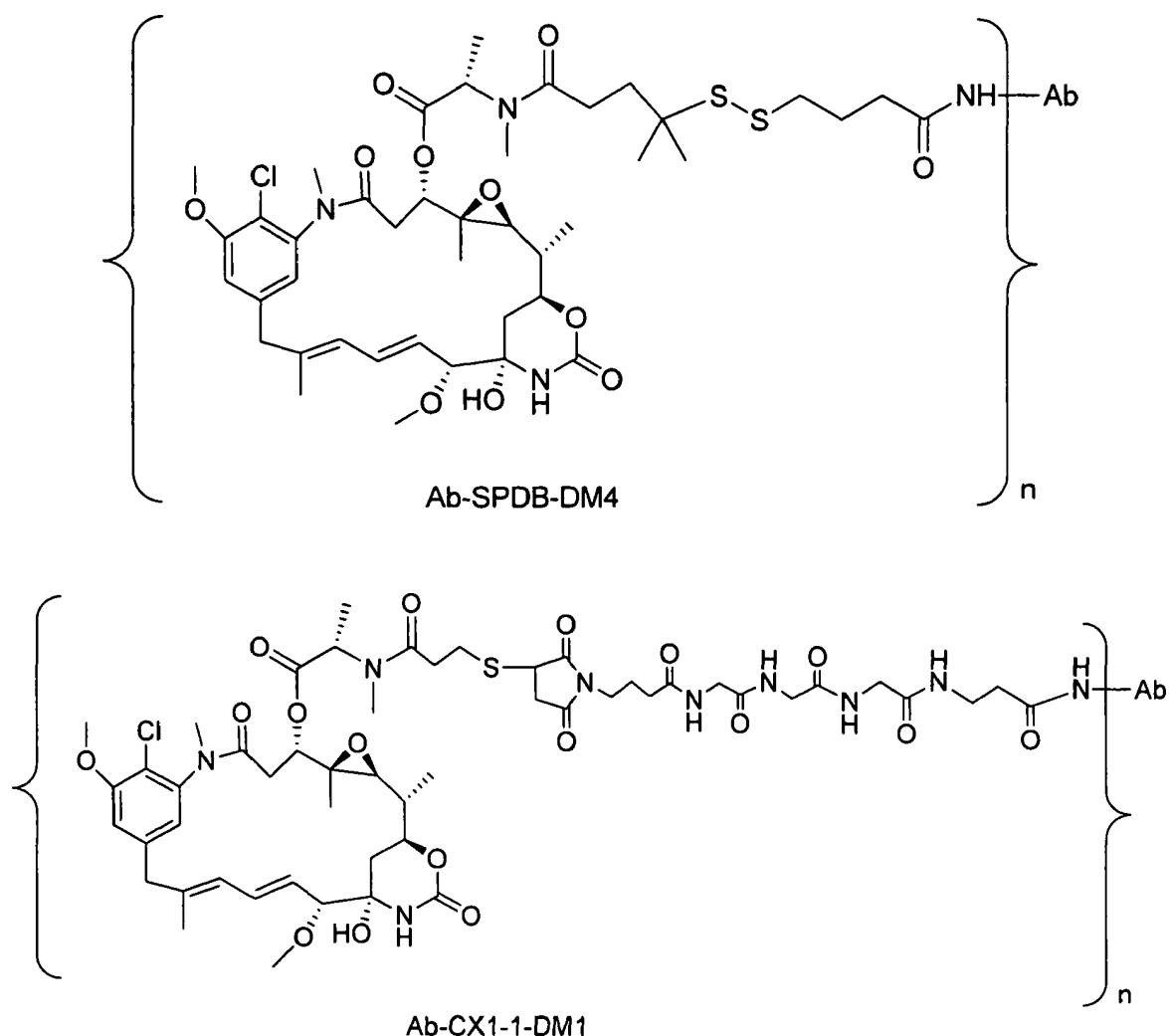
17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-

4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)

上文所描繪之各交聯試劑在交聯試劑的一端含有與抗體之一級胺反應而形成醯胺鍵的NHS酯且在另一端含有與類美登素藥物部分之氫硫基反應而形成硫醚或二硫鍵的順丁烯二醯亞胺基團或吡啶基二硫化物基團。

在一個實施例中，本發明之結合物由任一個以下結構式表示。





其中：

Ab為特異性結合至人類FGFR2與FGFR4之抗體或其抗原結合片段；

n(其指示經由與Ab之一級胺形成醯胺鍵而連接至Ab之D-L基團數目)為整數1至20。在一個實施例中，n為整數1至10、2至8，或2至5。在一特定實施例中，n為3或4。

在一個實施例中，結合物中藥物(例如DM1或DM4)與抗體之平均莫耳比(亦即平均n值，亦稱為類美登素抗體比率(MAR))為約1至約10、約2至約8 (例如1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、

5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0或8.1)、約2.5至約7、約3至約5、約2.5至約4.5 (例如約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5)、約3.0至約4.0、約3.2至約4.2、或約4.5至5.5 (例如約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4或約5.5)。

在本發明之一個態樣中，本發明之結合物具有實質上較高的純度且具有一或多個以下特徵：(a)結合物物種中大於約90% (例如大於或等於約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)、較佳大於約95%為單體；(b)結合物製劑中之非結合連接子含量小於約10% (例如小於或等於約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%) (相對於總連接子)；(c)結合物物種中小於10%發生交聯(例如小於或等於約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)；(d)結合物製劑中之游離藥物(例如DM1或DM4)含量小於約2% (例如小於或等於約1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%) (mol/mol，相對於總細胞毒性劑)；及/或(e)儲存後(例如約1週、約2週、約3週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約1年、約2年、約3年、約4年或約5年之後)，游離藥物(例如DM1或DM4)含量未發生實質性增加。游離藥物(例如DM1或DM4)含量之「實質性增加」意謂在一定儲存時間(例如約1週、約2週、約3週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約1年、約2年、約3年、約4年或約5年)之後，游離藥物(例如DM1或DM4)含量增加小於約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約

0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2.0%、約2.2%、約2.5%、約2.7%、約3.0%、約3.2%、約3.5%、約3.7%或約4.0%。

如本文所用，術語「非結合連接子」係指抗體與衍生自交聯試劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)之連接子共價連接，其中抗體與藥物(例如DM1或DM4)不經由連接子共價偶合(亦即，「非結合連接子」可由Ab-MCC、Ab-SPDB或Ab-CX1-1表示)。

1. 藥物部分

本發明提供特異性結合至FGFR2/4的免疫結合物。本發明之免疫結合物包含抗FGFR2/4抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物與藥物部分之結合物，藥物部分例如抗癌劑、自體免疫治療劑、消炎劑、抗真菌劑、抗細菌劑、抗寄生蟲劑、抗病毒劑或麻醉劑。本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可使用此項技術中已知的任何方法結合至若干個相同或不同藥物部分。

在某些實施例中，本發明之免疫結合物中的藥物部分係選自由以下組成之群：V-ATP酶抑制劑、促細胞凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧利斯他汀、海兔毒素、類美登素、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、蛋白質CRM1之核輸出抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、RNA聚合酶抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損壞劑、DNA烷基化劑、DNA插入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。

在一個實施例中，本發明之免疫結合物中的藥物部分為類美登素藥物部分，諸如(但不限於) DM1、DM3或DM4。

另外，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可與調節指定生物反應的藥物部分結合。藥物部分不應解釋為限於經典化學治療劑。舉例而言，藥物部分可為具有所要生物活性之蛋白質、肽或多肽。此等蛋白質可包括例如毒素，諸如相思豆毒素、蓖麻素A、綠膿桿菌外毒素、霍亂毒素或白喉毒素；蛋白質，諸如腫瘤壞死因子、 α -干擾素、 β -干擾素、神經生長因子、血小板源生長因子、組織纖維蛋白溶酶原活化因子、細胞激素、細胞凋亡劑、抗血管生成劑，或生物反應調節物，諸如淋巴激素。

在一個實施例中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物結合至藥物部分，諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素。細胞毒素之實例包括(但不限於)紫杉烷(參見例如國際(PCT)專利申請案第WO 01/38318號及PCT/US03/02675)、DNA烷基化劑(例如CC-1065類似物)、蔥環黴素、吐布辛類似物(tubulysin analogs)、多卡米辛類似物、奧利斯他汀E、奧利斯他汀F、類美登素，及包含反應性聚乙二醇部分的細胞毒性劑(參見例如Sasse等人, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000)；Suzawa等人, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura等人, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)；Francisco等人, Blood (2003) (電子公開，隨後印刷版公開)；美國專利第5,475,092號、第6,340,701號、第6,372,738號及第6,436,931號；美國專利申請公開案第2001/0036923 A1號；申請中之美國專利申請案第10/024,290號及第10/116,053號，及國際(PCT)專利申請案第WO 01/49698號)；紫杉醇、細胞遲緩素B (cytochalasin B)、短桿菌肽D (gramicidin D)、溴化乙錠、依米丁(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(t. colchicin)、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(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-脫氫鞣固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)，及其類似物或同源物。治療劑亦包括例如抗代謝物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、達卡巴嗪(dacarbazine)、消除劑(例如二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、噻替派(thiotepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法倫(meiphalan)、卡莫司汀(carmustine) (BSNU)及洛莫司汀(lomustine) (CCNU)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、鏈佐黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C及順二氯乙二胺鉑(II) (DDP)、順鉑(cisplatin)、蒽環黴素(例如道諾黴素(先前為柔紅黴素(daunomycin))及阿黴素)、抗生素(例如放線菌素D(先前為放線菌素A (actinomycin))、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素及安黴黴素(anthramycin) (AMC))，及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。(參見Seattle Genetics US20090304721)。

可與本發明之抗體、抗體片段(抗原結合片段)或功能等效物結合之細胞毒素的其他實例包括多卡米辛(duocarmycins)、卡奇黴素(calicheamicins)、美登素(maytansines)及奧利斯他汀，及其衍生物。

用於治療劑與抗體結合之各種類型的細胞毒素、連接子及方法在此項技術中已知，參見例如Saito等人, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215；Trail等人, (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337；Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212；Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763；Pastan及Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091；Senter及Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev.

53:247-264。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可與放射性同位素結合，以產生細胞毒性放射性藥物，稱為放射性免疫結合物。可與抗體結合而用於診斷或治療性用途之放射性同位素實例包括(但不限於)碘-131、銥-111、釷-90及鐳-177。用於製備放射性免疫結合物的方法在此項技術中已確立。放射性免疫結合物之實例可市購，包括 Zevalin® (DEC Pharmaceuticals) 及 Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals)，且可利用類似方法製備使用本發明抗體之放射性免疫結合物。在某些實施例中，巨環螯合劑為1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)，其可經由連接分子連接至抗體。此等連接分子在此項技術中普遍已知且描述於 Denardo 等人，(1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90；Peterson 等人，(1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7；及 Zimmerman 等人，(1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50，各文獻均以全文引用的方式併入本文中。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可結合至異源蛋白質或多肽(或其片段，較佳結合至至少10個、至少20個、至少30個、至少40個、至少50個、至少60個、至少70個、至少80個、至少90個或至少100個胺基酸之多肽)以產生融合蛋白。詳言之，本發明提供的融合蛋白包含本文所述之抗體片段(例如抗原結合片段)(例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)2片段、VH域、VH CDR、VL域或VL CDR)及異源蛋白質、多肽或肽。

其他融合蛋白可經由基因改組、基元改組、外顯子改組及/或密碼子改組技術(統稱為「DNA改組」)產生。DNA改組可用於改變本發明抗體或其片段(例如具有較高親和力及較低解離速率之抗體或其片段)之活性。一般參見美國專利第5,605,793號、第5,811,238號、第5,830,721號、第5,834,252號及第5,837,458號；Patten 等人，(1997)

Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 ; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82 ; Hansson等人, (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76 ; 及Lorenzo及Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308- 313 此等專利及公開案各以全文引用的方式特此併入本文中)。抗體或其片段，或所編碼抗體或其片段，可藉由易出錯PCR、隨機核苷酸插入或其他方法經受隨機突變誘發、隨後重組來改變。編碼特異性結合至抗原之抗體或其片段的聚核苷酸可與一或多種異源分子之一或多個組分、基元、區段、部分、域、片段等重組。

此外，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可與諸如肽之標記物序列結合，以便於純化。在較佳實施例中，標記物胺基酸序列為六組胺酸肽，諸如pQE載體(QIAGEN®, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)中所提供之標籤，其中許多可市面上購得。如Gentz等人, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824中所述，例如六組胺酸為融合蛋白之純化提供方便。適用於純化之其他肽標籤包括(但不限於)血球凝集素(「HA」)標籤，其對應於來源於流感血球凝集素蛋白的抗原決定基(Wilson等人, (1984) Cell 37:767)；及「FLAG®」標籤(A. Einhauer等人, J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001)。根據本發明，抗體或抗原結合片段亦可與腫瘤滲透肽結合以便增強其功效。

在其他實施例中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物與診斷劑或可偵測劑結合。此等免疫結合物可作為臨床測試程序之一部分(諸如確定特定療法之功效)用於監測或預後疾病或病症之發作、發展、進展及/或嚴重程度。此診斷及偵測可藉由使抗體與可偵測物質偶合來完成，可偵測物質包括(但不限於)各種酶，諸如(但不限於)辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；輔基，諸如(但不限於)抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生物素蛋白

/生物素；螢光材料，諸如(但不限於)Alexa Fluor® 350、Alexa Fluor® 405、Alexa Fluor® 430、Alexa Fluor® 488、Alexa Fluor® 500、Alexa Fluor® 514、Alexa Fluor® 532、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、Alexa Fluor® 568、Alexa Fluor® 594、Alexa Fluor® 610、Alexa Fluor® 633、Alexa Fluor® 647、Alexa Fluor® 660、Alexa Fluor® 680、Alexa Fluor® 700、Alexa Fluor® 750、繖酮(umbelliferone)、螢光素(fluorescein)、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯、或藻紅蛋白(phycoerythrin)；發光材料，諸如(但不限於)魯米諾(luminol)；生物發光材料，諸如(但不限於)螢光素酶、蟲螢光素(luciferin)及水母素(aequorin)；放射性材料，諸如(但不限於)碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 及 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、銦(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 及 ^{111}In)、鎝(^{99}Tc)、鈦(^{201}Ti)、鎵(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、鈀(^{103}Pd)、鉬(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{64}Cu 、 ^{113}Sn 及 ^{117}Sn ；使用各種正電子發射斷層攝影的正電子發射金屬，及非放射性順磁性金屬離子。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可連接至特別適用於免疫分析或純化目標抗原的固體支撐物。該等固體支撐物包括(但不限於)玻璃、纖維素、聚丙烯醯胺、耐綸(nylon)、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

2. 連接子

如本文所用，「連接子」為能夠使抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物與另一部分(諸如藥物部分)連接的任何化學部分。在一些情況下，連接子之一部分係由類美登素提供。舉例而言，DM1(含有硫醇之類美登素)為天然類美登素之衍生物，且提供連接子之一

部分。位於美登素之C-3羥基上的側鏈末端為 CO-CH_3 ，DM1側鏈末端為 $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ 。因此，最終連接子係由兩段(引入抗體內之交聯試劑及DM1側鏈)組裝而成。連接子在化合物或抗體保持活性的條件下容易發生分裂(可分裂連接子)，諸如酸誘導性分裂、光誘導性分裂、肽酶誘導性分裂、酯酶誘導性分裂及二硫鍵分裂。或者，連接子對分裂可具實質上抗性(例如穩定連接子或不可分裂連接子)。在一些態樣中，連接子為預帶電連接子、親水性連接子或基於二羧酸之連接子。

不可分裂連接子為能夠使藥物(諸如類美登素)與抗體以穩定共價方式連接且在上文針對可分裂連接子所列之類別下不衰減的任何化學部分。因此，不可分裂連接子對酸誘導性分裂、光誘導性分裂、肽酶誘導性分裂、酯酶誘導性分裂及二硫鍵分裂具有實質上抗性。此外，不可分裂係指連接子中或鄰近連接子之化學鍵能夠耐受由酸、光不穩定性分裂劑、肽酶、酯酶或化學或生理學化合物所誘導的分裂，該等物在藥物(諸如類美登素)或抗體不失去其活性的條件使二硫鍵分裂。

含二硫化物連接子為經由二硫化物交換可分裂的連接子，二硫化物交換可在生理條件下發生。酸不穩定性連接子為在酸性pH值可分裂的連接子。舉例而言，某些細胞內代謝區(諸如核內體及溶酶體)具有酸性pH (pH 4-5)，且提供適於使酸不穩定性連接子分裂的條件。

光不穩定性連接子為適用於體表及可接取光之許多體腔內的連接子。此外，紅外光可滲透組織。

一些連接子可藉由肽酶分裂，亦即肽酶可分裂連接子。僅某些肽容易在細胞內部或外部分裂，參見例如Trout等人，79 Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 626-629 (1982)及Umemoto等人 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989)。此外，肽由 α -胺基酸及肽鍵組成，肽鍵在化學上為一個胺基酸之羧酸酯與第二個胺基酸之胺基之間的醯胺鍵。應瞭解，其他

醯胺鍵(諸如羧酸酯與離胺酸之 ϵ -胺基之間的鍵)不為肽鍵且視為不可分裂。

一些連接子可藉由酯酶分裂，亦即酯酶可分裂連接子。又，僅某些酯可藉由存在於細胞內部或外部的酯酶分裂。羧酸與醇縮合而形成酯。簡單酯為用簡單醇(諸如脂族醇)、及小環及小芳族醇製備的酯。

預帶電連接子衍生自帶電交聯試劑，帶電交聯試劑在併入抗體藥物結合物內之後保持其電荷。預帶電連接子之實例可見於US 2009/0274713。

在一個態樣中，本發明所用的連接子衍生自交聯試劑，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)、4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(sulfo-SPDB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)。在另一個態樣中，本發明所用的連接子衍生自交聯試劑，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)、4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(sulfo-SPDB)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)。

3. ADC之結合及製備

本發明之結合物可藉由此項技術中已知的任何方法製備，諸如以下文獻中所述之方法：美國專利第7,811,572號、第6,411,163號、第7,368,565號及第8,163,888號，及美國申請公開案2011/0003969、2011/0166319、2012/0253021及2012/0259100。此等專利及專利申請公開案之整個教示內容以引用的方式併入本文中。

一步法

在一個實施例中，本發明之結合物可藉由一步法製備。該方法包含將抗體、藥物及交聯劑合併於具有適合pH的實質上水性介質中，此水性介質視情況含有一或多種共溶劑。在一個實施例中，方法包含以下步驟：使本發明抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸而形成包含抗體及藥物的第一混合物，接著使包含抗體及藥物的第一混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在pH為約4至約9的溶液中接觸而得到混合物，該混合物包含(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物。

在一個實施例中，一步法包含以下步驟：使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸，接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在pH為約6或大於6(例如約6至約9、約6至約7、約7至約9、約7至約8.5、約7.5至約8.5、約7.5至約8.0、約8.0至約9.0，或約8.5至約9.0)的溶液中接觸。舉例而言，本發明方法包含以下步驟：使細胞結合劑與藥物(DM1或DM4)接觸，接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在溶液中接觸，該溶液之pH為約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.8、約7.9、約8.0、約8.1、約8.2、約8.3、約

8.4、約8.5、約8.6、約8.7、約8.8、約8.9或約9.0。在一個特定實施例中，本發明方法包含以下步驟：使細胞結合劑與藥物(例如DM1或DM4)接觸，接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在pH為約7.8 (例如pH為7.6至8.0或pH為7.7至7.9)的溶液中接觸。

一步法(亦即使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸，接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸)可在此項技術中已知的任何適合溫度下進行。舉例而言，一步法可在約20℃或小於20℃ (例如約-10℃ (限制條件為防止溶液冷凍，例如藉由存在用於溶解細胞毒性劑及雙官能交聯試劑的有機溶劑)至約20℃、約0℃至約18℃、約4℃至約16℃)、在室溫(例如約20℃至約30℃或約20℃至約25℃)下、或在高溫(例如約30℃至約37℃)下進行。在一個實施例中，一步法係在約16℃至約24℃ (例如約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃或約25℃)之溫度下進行。在另一個實施例中，一步法係在約15℃或小於15℃ (例如約-10℃至約15℃，或約0℃至約15℃)之溫度下進行。舉例而言，方法包含以下步驟：使抗體與藥物(例如DM1或DM4)且接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在約15℃、約14℃、約13℃、約12℃、約11℃、約10℃、約9℃、約8℃、約7℃、約6℃、約5℃、約4℃、約3℃、約2℃、約1℃、約0℃、約-1℃、約-2℃、約-3℃、約-4℃、約-5℃、約-6℃、約-7℃、約-8℃、約-9℃或約-10℃之溫度下接觸，限制條件為防止溶液冷凍，例如藉由存在用於溶解交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、Sulfo-SPDB、SPDB、或CX1-1)的有機溶劑。在一個實施例中，方法包含以下步驟：使抗體與藥物(例如DM1或DM4)且接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在約-10℃至約15℃、約0

℃至約15℃、約0℃至約10℃、約0℃至約5℃、約5℃至約15℃、約10℃至約15℃或約5℃至約10℃)之溫度下接觸。在另一個實施例中，方法包含以下步驟：使抗體與藥物(例如DM1或DM4)且接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在約10℃溫度(例如8℃至12℃之溫度或9℃至11℃之溫度)下接觸。

在一個實施例中，上述接觸如下實現：提供抗體，接著使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸而形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的第一混合物，且接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的第一混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸。舉例而言，在一個實施例中，抗體提供於反應容器中，向反應容器中添加藥物(例如DM1或DM4) (藉此接觸抗體)，且接著向包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物中添加交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1) (藉此接觸包含抗體及藥物的混合物)。在一個實施例中，抗體提供於反應容器中，且將抗體提供至容器中之後，隨即向反應容器中添加藥物(例如DM1或DM4)。在另一個實施例中，抗體提供於反應容器中，且在將抗體提供至容器中後的一定時間間隔(例如在將細胞結合劑提供至空間後的約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約40分鐘、約50分鐘、約1小時、約1天或多於1天)之後，向反應容器中添加藥物(例如DM1或DM4)。藥物(例如DM1或DM4)可快速(亦即在短時間間隔內，諸如約5分鐘、約10分鐘)或緩慢(諸如藉由使用泵)添加。

接著可在抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後立即或在抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後的一段稍後時點(例如約5分鐘至約8小時或長於8小時)，使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸。舉例而言，在一個實施例中，在藥物(例如DM1或DM4)添加至包

含抗體的反應容器中之後，立即向包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物中添加交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)。或者，可在抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後的約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時或長於8小時時，使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸。

使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸之後，允許反應進行約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或長於24小時(例如約30小時、約35小時、約40小時、約45小時或約48小時)。

在一個實施例中，一步法進一步包含淬滅任何未反應藥物(例如DM1或DM4)及/或未反應交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)的淬滅步驟。淬滅步驟典型地在純化結合物之前進行。在一個實施例中，藉由使混合物與淬滅試劑接觸來淬滅混合物。如本文所用，「淬滅試劑」係指與游離藥物(例如DM1或DM4)及/或交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)反應的試劑。在一個實施例中，順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯胺淬滅試劑，諸如4-順丁烯二醯亞胺基丁酸、3-順丁烯二醯亞胺基丙酸、N-乙基順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺或碘乙醯胺基丙酸，可用於保證藥物(例如DM1或DM4)中之任何未反應基團(諸如硫醇)淬滅。淬滅步驟可有助於藥物(例如DM1)二聚合。二聚DM1難以移除。用極性帶電硫醇淬滅

試劑(諸如4-順丁烯二醯亞胺基丁酸或3-順丁烯二醯亞胺基丙酸)淬滅時，過量的未反應DM1轉化為極性帶電水溶性加合物，在純化步驟期間，該加合物容易與共價連接的結合物分離。亦可使用非極性及中性硫醇淬滅試劑進行淬滅。在一個實施例中，藉由使混合物與和未反應交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)反應之淬滅試劑接觸來淬滅混合物。舉例而言，可向混合物中添加親核試劑以便淬滅任何未反應SMCC。親核試劑較佳為含胺基親核試劑，諸如離胺酸、牛磺酸及羥胺。

在一個較佳實施例中，在混合物與淬滅試劑接觸之前，允許反應(亦即抗體與藥物(例如DM1或DM4)且接著與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸)進行直至完成。就此而言，在使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸之後的約1小時至約48小時(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或約25小時至約48小時)時，向混合物中添加淬滅試劑。

或者，藉由將混合物之pH降低至約5.0 (例如4.8、4.9、5.0、5.1或5.2)來淬滅混合物。在另一個實施例中，藉由將pH降低至小於6.0、小於5.5、小於5.0、小於4.8、小於4.6、小於4.4、小於4.2、小於4.0來淬滅混合物。或者，將pH降低至約4.0 (例如3.8、3.9、4.0、4.1或4.2)至約6.0 (例如5.8、5.9、6.0、6.1或6.2)、約4.0至約5.0、約4.5 (例如4.3、4.4、4.5、4.6或4.7)至約5.0。在一個實施例中，藉由將混合物之pH降低至4.8來淬滅混合物。在另一個實施例中，藉由將混合物之pH降低至5.5來淬滅混合物。

在一個實施例中，一步法進一步包含使不穩定結合連接子自抗體釋放的保存步驟。保存步驟包含在純化結合物之前保存混合物(例如反應步驟之後、反應步驟與淬滅步驟之間，或淬滅步驟之後)。舉例而言，方法包含(a)使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸而形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物；接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在pH為約4至約9的溶液中接觸而得到混合物，該混合物包含(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物；(b)保存步驟(a)中所製備之混合物以使不穩定結合的連接子自細胞結合劑釋放；及(c)純化混合物而得到純化結合物。

在另一個實施例中，方法包含(a)使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸而形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物；接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)在pH為約4至約9的溶液中接觸，得到包含(i)結合物、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物的混合物；(b)將步驟(a)中所製備之混合物淬滅以淬滅任何未反應藥物(例如DM1或DM4)及/或未反應交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)；(c)保存步驟(b)中所製備之混合物以使不穩定結合的連接子自細胞結合劑釋放；及(d)純化混合物而提供純化結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)。

或者，可在純化結合物之後進行保存步驟，隨後為另一純化步驟。

在一個較佳實施例中，在保存步驟之前，允許反應進行至完成。就此而言，在使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交

聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸之後的約1小時至約48小時(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或約24小時至約48小時)時，進行保存步驟。

保存步驟包含使溶液在適合溫度(例如約0°C至約37°C)下維持適合時段(例如約1小時至約1週、約1小時至約24小時、約1小時至約8小時，或約1小時至約4小時)，以使不穩定結合的连接子自抗體釋放，同時不會使穩定結合的连接子自抗體釋放。在一個實施例中，保存步驟包含使溶液在約20°C或小於20°C (例如約0°C至約18°C、約4°C至約16°C)、在室溫(例如約20°C至約30°C或約20°C至約25°C)下，或在高溫(例如約30°C至約37°C)下維持。在一個實施例中，保存步驟包含使溶液在約16°C至約24°C (例如約15°C、約16°C、約17°C、約18°C、約19°C、約20°C、約21°C、約22°C、約23°C、約24°C或約25°C)之溫度下維持。在另一個實施例中，保存步驟包含使溶液在約2°C至約8°C (例如約0°C、約1°C、約2°C、約3°C、約4°C、約5°C、約6°C、約7°C、約8°C、約9°C或約10°C)之溫度下維持。在另一個實施例中，保存步驟包含使溶液在約37°C (例如約34°C、約35°C、約36°C、約37°C、約38°C、約39°C或約40°C)之溫度下維持。

保存步驟之持續時間視保存步驟進行時的溫度及pH而定。舉例而言，在高溫下進行保存步驟可實質上減少保存步驟之持續時間，最高溫度係由細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之穩定性限定。保存步驟可包含使溶液維持約1小時至約1天(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約12小時、約14小時、約16小時、約18小時、約20小時、約

22小時或約24小時)、約10小時至約24小時、約12小時至約24小時、約14小時至約24小時、約16小時至約24小時、約18小時至約24小時、約20小時至約24小時、約5小時至約1週、約20小時至約1週、約12小時至約1週(例如約12小時、約16小時、約20小時、約24小時、約2天、約3天、約4天、約5天、約6天或約7天), 或約1天至約1週。

在一個實施例中, 保存步驟包含使溶液在約2°C至約8°C之溫度下維持至少約12小時、長達一週之時段。在另一個實施例中, 保存步驟包含使溶液在約2°C至約8°C的溫度下維持隔夜(例如約12小時至約24小時, 較佳約20小時)。

保存步驟之pH值較佳為約4至約10。在一個實施例中, 保存步驟之pH值為約4或大於4, 但小於約6 (例如4至5.9), 或為約5或大於5, 但小於約6 (例如5至5.9)。在另一個實施例中, 用於保存步驟之pH值的範圍為約6至約10 (例如約6.5至約9、約6至約8)。舉例而言, 用於保存步驟之pH值可為約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5或約10。

在特定實施例中, 保存步驟可包含將混合物在25°C、在約6-7.5之pH培育約12小時至約1週; 將混合物在4°C、在約4.5-5.9之pH培育約5小時至約5天; 或將混合物在25°C、在約4.5-5.9之pH培育約5小時至約1天。

一步法視情況可包括向反應步驟中添加蔗糖以提高結合物之溶解性及回收率。蔗糖的添加濃度宜為約0.1% (w/v)至約20% (w/v) (例如約0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)或20% (w/v))。蔗糖的添加濃度較佳為約1% (w/v)至約10% (w/v) (例如約0.5% (w/v)、約1% (w/v)、約1.5% (w/v)、約2% (w/v)、約3% (w/v)、約4% (w/v)、約5% (w/v)、約6% (w/v)、約7% (w/v)、約8% (w/v)、約9% (w/v)、約10% (w/v)或約11% (w/v))。另外, 反應步驟亦可包含添

加緩衝劑。可使用此項技術中已知的任何適合緩衝劑。適合緩衝劑包括例如檸檬酸鹽緩衝劑、乙酸鹽緩衝劑、丁二酸鹽緩衝劑及磷酸鹽緩衝劑。在一個實施例中，緩衝劑係選自由以下組成之群：HEPPSO (N-(2-羥基乙基)哌嗪-N'-(2-羥基丙烷磺酸))、POPSO (哌嗪-1,4-雙(2-羥基-丙烷磺酸)脫水物)、HEPES (4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-乙烷磺酸)、HEPPS (EPPS) (4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-丙烷磺酸)、TES (N-[參(羥甲基)甲基]-2-胺基乙烷磺酸)，及其組合。

在一個實施例中，一步法可進一步包含純化混合物以得到純化結合物(例如 Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4 或 Ab-CX1-1-DM1)的步驟。可利用此項技術中已知的任何純化方法純化本發明結合物。在一個實施例中，本發明之結合物使用切向流過濾(TFF)、非吸附性層析、吸附性層析、吸附性過濾、選擇性沈澱，或任何其他適合純化方法，以及其組合。在另一個實施例中，在對結合物進行上述純化方法之前，首先經由一或多個PVDF膜過濾結合物。或者，在對結合物進行上述純化方法之後，經由一或多個PVDF膜過濾結合物。舉例而言，在一個實施例中，結合物經由一或多個PVDF膜過濾，接著使用切向流過濾純化。或者，使用切向流過濾、接著經由一或多個PVDF膜過濾來純化結合物。

可使用任何適合 TFF 系統進行純化，包括 Pellicon® 型系統 (Millipore, Billerica, MA)、Sartocon® 卡匣系統 (Sartorius AG, Edgewood, NY) 及 Centrasette™ 型系統 (Pall Corp., East Hills, NY)。

任何適合的吸附性層析樹脂可用於純化。較佳的吸附性層析樹脂包括羥磷灰石層析、疏水性電荷誘導層析(HCIC)、疏水性相互作用層析(HIC)、離子交換層析、混合模式離子交換層析、固著金屬親和性層析(IMAC)、染料配位體層析、親和性層析、逆相層析，及其組合。適合羥磷灰石樹脂之實例包括陶瓷羥磷灰石(I型及II型 CHT，

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogel® 脛磷灰石(Pall Corp., East Hills, NY), 及陶瓷氟磷灰石(I型及II型CFT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合HCIC樹脂之實例為MEP Hypercel™ 樹脂(Pall Corp., East Hills, NY)。適合HIC樹脂之實例包括Butyl-Sepharose®、Hexyl-Sepharose®、Phenyl-Sepharose®及Octyl-Sepharose®樹脂(皆得自GE Healthcare, Piscataway, NJ), 以及Macro-prep甲基及Macro-Prep第三丁基樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, CA)。適合離子交換樹脂之實例包括SP-Sepharose®、CM-Sepharose®及Q-Sepharose®樹脂(皆得自GE Healthcare, Piscataway, NJ), 及Unosphere™ S樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合混合模式離子交換劑之實例包括Bakerbond® ABx樹脂(JT Baker, Phillipsburg NJ)。適合IMAC樹脂之實例包括Chelating Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)及Profinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合染料配位體樹脂之實例包括Blue Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)及Affi-gel®藍色樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合親和性樹脂之實例包括Protein A Sepharose®樹脂(例如MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ)及凝集素親和性樹脂, 例如Lentil Lectin Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ), 其中抗體具有適當凝集素結合位點。適合逆相樹脂之實例包括C4、C8及C18樹脂(Grace Vydac, Hesperia, CA)。

任何適合的非吸附性層析樹脂可用於純化。適合之非吸附性層析樹脂之實例包括(但不限於) SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™樹脂(例如S-200及S-300)、SUPERDEX™樹脂(例如SUPERDEX™ 75及SUPERDEX™ 200)、BIO-GEL®樹脂(例如P-6、P-10、P-30、P-60及P-100), 及一般技術者已知的其他樹脂。

兩步法及單釜法

在一個實施例中，本發明結合物可如美國專利7,811,572及美國專利申請公開案第2006/0182750號中所述製備。方法包含以下步驟：

(a)使本發明抗體與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)接觸以使連接子(亦即Ab-SMCC、Ab-SPDB或Ab-CX1-1)共價連接至抗體且藉此製備第一混合物，該第一混合物包含连接有連接子的抗體；(b)視情況對第一混合物進行純化方法以製備經純化的第一混合物，該經純化第一混合物具有连接有連接子的抗體；(c)藉由使连接有連接子之抗體與藥物(例如DM1或DM4)在具有約4至約9之pH之溶液中反應來使藥物(例如DM1或DM4)與第一混合物中之连接有連接子之抗體結合，以製備第二混合物，該第二混合物包含(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物；及(d)對第二混合物進行純化方法，以自第二混合物之其他組分純化結合物。或者，可省略純化步驟(b)。步驟(b)及(d)可使用本文所述的任何純化方法。在一個實施例中，步驟(b)與步驟(d)均使用TFF。在另一個實施例中，步驟(b)使用TFF且步驟(d)使用吸收性層析(例如CHT)。

一步試劑及原位法

在一個實施例中，本發明之結合物可藉由使預形成的藥物-連接子化合物(例如SMCC-DM1、Sulfo-SMCC-DM1、SPDB-DM4或CX1-1-DM1)與本發明抗體結合(如美國專利6,441,163及美國專利申請公開案第2011/0003969號及第2008/0145374號中所述)、隨後進行純化步驟來製備。可使用本文所述的任何純化方法。藥物-連接子化合物係藉由使藥物(例如DM1或DM4)與交聯劑(例如SMCC、Sulfo-SMCC、SPDB、Sulfo-SPDB或CX1-1)反應而製備。藥物-連接子化合物(例如SMCC-DM1、Sulfo-SMCC-DM1、SPDB-DM4或CX1-1-DM1)在與抗體

結合之前，視情況進行純化。

4.表徵及選擇所要抗體及抗體藥物結合物

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物的物理/化學特性及/或生物活性可藉由此項技術中已知的各種分析進行表徵及選擇。

舉例而言，本發明抗體之抗原結合活性可藉由已知方法(諸如ELISA、FACS、Biacore®或西方墨點法)進行測試。

轉基因動物及細胞株特別適用於篩選抗體藥物結合物(ADC)，該等抗體藥物結合物具有預防性或治療性治療過度表現腫瘤相關抗原及細胞表面受體之癌症的潛力。篩選有用ADC可包括向轉基因動物投與劑量範圍的候選ADC，且分析評估各時間點ADC對疾病或病症的作用。或者或另外，適用時，可在暴露於疾病誘發物之前或同時投與藥物。可依序且個別地，或並行地在中等或高輸送量篩選格式下篩選候選ADC。

一個實施例為包含以下之篩選法：(a)將來源於表現FGFR2或FGFR4之穩定癌細胞株或人類患者腫瘤(例如乳癌細胞株或腫瘤片段、胃癌細胞株或腫瘤片段)之細胞移植入非人類動物；(b)向該非人類動物投與ADC候選藥物及(c)測定候選藥物抑制所移植細胞株生長成腫瘤的能力。本發明亦包涵一種篩選ADC候選藥物用於治療以過度表現FGFR2或FGFR4為特徵之疾病或病症的方法，包含(a)使來源於表現FGFR2或FGFR4之穩定癌細胞株的細胞與候選藥物接觸，及(b)評估ADC候選藥物抑制穩定細胞株生長的能力。

一個實施例為篩選法，包含(a)使來源於表現FGFR2或FGFR4之穩定癌細胞株的細胞與ADC候選藥物接觸及(b)評估ADC候選藥物阻止FGFR2或FGFR4配位體活化的能力。在另一個實施例中，評估ADC候選藥物阻止配位體刺激之酪胺酸磷酸化的能力。

另一個實施例為篩選法；包含(a)使來源於表現FGFR2或FGFR4之穩定癌細胞株的細胞與ADC候選藥物接觸及(b)評估ADC候選藥物誘導細胞死亡的能力。在一個實施例中，評估ADC候選藥物誘導細胞凋亡的能力。

在一個實施例中，藉由在劑量範圍內投與轉基因動物及評估動物隨時間對化合物的生理反應來篩選候選ADC。在一些情況下，化合物宜連同增強化合物功效之輔因子一起投與。若利用來源於個體轉基因動物的細胞株篩選適用於治療與FGFR2或FGFR4過度表現有關之各種病症的ADC，則在適當時間時向細胞培養基中添加測試ADC，且使用適當生物化學及/或組織學分析法評估對ADC的細胞反應(隨時間)。

因此，本發明提供用於鑑別特異性靶向且結合至FGFR2與FGFR4之ADC的分析，FGFR2與FGFR4在腫瘤細胞中的過度表現及擴增與異常細胞功能相關。在一個實施例中，本發明提供包含抗FGFR2/4抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)的ADC，其具有以下特徵：結合至MCC-DM1或SPDB-DM4之後，對人類FGFR2的親和力小於10 nM；能夠以小於2 nM之IC₅₀抑制FGFR2/4已擴增及/或過度表現FGFR2/4之細胞的生長；清除率緩慢，例如在單次3 mg/kg IV劑量之後，小鼠清除率小於45 ml/d/kg。

FGFR2/4抗體

本發明提供特異性結合至人類FGFR2與FGFR4 (FGFR2/4)之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)。本發明之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包括(但不限於)如實例(參見下文第6章節)所述分離的人類單株抗體或其片段。

在某些實施例中，本發明提供特異性結合FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 7、27、47、67、87或107的VH域。

在某些實施例中，本發明亦提供特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有下表1中所列之任一VH CDR之胺基酸序列的VH CDR。在特定實施例中，本發明提供特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體包含(或者由以下組成)一個、兩個、三個、四個、五個或五個以上具有下表1中所列之任一VH CDR之胺基酸序列的VH CDR。

本發明提供特異性結合至FGFR2/4之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 17、37、57、77、97或117之VL域。本發明亦提供特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有下表1中所列之任一VL CDR之胺基酸序列的VL CDR。詳言之，本發明提供特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含(或者由以下組成)一個、兩個、三個或三個以上具有下表1中所列之任一VL CDR之胺基酸序列的VL CDR。

本發明之其他抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包括已突變的胺基酸，然而CDR區與表1所述序列中之所描繪CDR區具有至少60%、70%、80%、90%或95%一致性。在一些實施例中，其包括突變型胺基酸序列，其中與表1所述序列中所描繪之CDR區相比，CDR區中不超過1個、2個、3個、4個或5個胺基酸已突變。

本發明亦提供核酸序列，該等核酸序列編碼特異性結合至FGFR2/4之抗體的VH、VL、全長重鏈及全長輕鏈。此等核酸序列可根據在哺乳動物細胞中的表現進行最佳化。

表1.本發明之抗FGFR2/4抗體之實例

mAb 12425		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	DYAMS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	VIEGDGSYTHYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EKTYSSAFDY
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	EGDGSY
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (Chothia)	EKTYSSAFDY
SEQ ID NO: 7	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKGLEWVSVIEGDGSYTHYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKTYSSAFDYWGQGLV TVSS
SEQ ID NO: 8	DNA VH	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGC AGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCTCC GGCTTCACCTTTAGCGACTACGCTATGAGCTGGGTCCG ACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCAGTG ATCGAGGGCGACGGTAGCTACACTCACTACGCCGATA GCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGGGACAACCTCT AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACCTCACTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAAA GACCTACTCTAGCGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA CCCTGGTCACCGTGTCATCA
SEQ ID NO: 9	重鏈	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKGLEWVSVIEGDGSYTHYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKTYSSAFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 10	DNA 重鏈	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGC AGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCTCC GGCTTCACCTTTAGCGACTACGCTATGAGCTGGGTCCG ACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCAGTG ATCGAGGGCGACGGTAGCTACACTCACTACGCCGATA GCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGGGACAACCTCT AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACCTCACTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAAA GACCTACTCTAGCGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA CCCTGGTCACCGTGTCATCAGCTAGCTAAGGGCCCCA AGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACT ACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGG GCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG ACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAAGTCTGTTGGA GGGCTTCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCAAAGGA CACCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGC GTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAAGTGAAGAGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAGACAA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGC CAGCCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCAGTGC TGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT

		TCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGAAG
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	LCDR1	RASQDISDLN
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	LCDR2	DASNLQS
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	LCDR3	QQHYSPSHT
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	LCDR1	SQDISSD
SEQ ID NO: 15 (Chothia)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 16 (Chothia)	LCDR3	HYSPSH
SEQ ID NO: 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISDLNHWYQKP GKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFAVYYCQQHYSPSHTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 18	DNA VL	GATATTGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGC CTCAGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCT CTCAGGACATCTCTAGCGACCTGAAGTGGTATCAGCAG AAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACG CCTCTAACCTGCAGAGCGGCGTGCCCTCTAGGTTAGC GGTAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACCCTGACTATCTC TAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTC AGCAGCACTATAGCCCTAGTCACACCTTCGGCCAGGGC ACTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 19	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISDLNHWYQKP GKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFAVYYCQQHYSPSHTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 20:	DNA輕鏈	GATATTGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGC CTCAGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCT CTCAGGACATCTCTAGCGACCTGAAGTGGTATCAGCAG AAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACG CCTCTAACCTGCAGAGCGGCGTGCCCTCTAGGTTAGC GGTAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACCCTGACTATCTC TAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTC AGCAGCACTATAGCCCTAGTCACACCTTCGGCCAGGGC ACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCT CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCGAGGCC TGTCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTAACAGGGGCGA GTGC
mAb 14629		
SEQ ID NO: 21	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 22	HCDR2 (Kabat)	YISPYMGETHYAQRFGQ
SEQ ID NO: 23	HCDR3 (Kabat)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 24	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 25	HCDR2 (Chothia)	SPYMGE
SEQ ID NO: 26	HCDR3 (Chothia)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 27	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGYISPYMGETHYAQRFGQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARESYEYFDIHWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGA AACCCGCTCTAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAAGCCTCC GGCGGCACCTTCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTCCG

		ACAGGCCCCAGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTAT ATTAGCCCCTATATGGGCGAGACTACTACGCTCAGCG GTTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTA CTAGCACCGCCTATATGGAACTGTCTAGCCTGAGATCA GAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGTCCTA CGAGTACTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCA CCGTGTCATCA
SEQ ID NO: 29	重鏈	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGYISPYMGETHYAQRFGQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARESEYFDIWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 30	DNA重鏈	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGA AACCCGGCTCTAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAAGCCTCC GGCGGCACCTTCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTCCG ACAGGCCCCAGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTAT ATTAGCCCCTATATGGGCGAGACTACTACGCTCAGCG GTTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTA CTAGCACCGCCTATATGGAACTGTCTAGCCTGAGATCA GAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGTCCTA CGAGTACTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCA CCGTGTCATCAGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTT CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAC TGCTGCCCTGGGTGCTTGGTGAAGGACTACTTCCCCG AGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCC CCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCG TGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATG ATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGG TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGG CCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTG CCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAG ACAATAACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGA CGGAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACA AGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 31 (Kabat)	LCDR1	RASQISNDLA
SEQ ID NO: 32 (Kabat)	LCDR2	ATSILQS
SEQ ID NO: 33 (Kabat)	LCDR3	LQYYDYSYT
SEQ ID NO: 34 (Chothia)	LCDR1	SQISND
SEQ ID NO: 35 (Chothia)	LCDR2	ATS
SEQ ID NO: 36	LCDR3	YYDYSY

(Chothia)		
SEQ ID NO: 37	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYATSIQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYYDYSYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 38	DNA VL	GATATTGAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTCAGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCCCAGTCTATCTCTAACGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCTACTCTATCCTGCAGAGCGGCGTGCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGCTCAGGACCGACTTACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCTGCAGTACTACGACTACTCTACACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 39	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYATSIQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYYDYSYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 40	DNA輕鏈	GATATTGAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTCAGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCCCAGTCTATCTCTAACGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCTACTCTATCCTGCAGAGCGGCGTGCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGCTCAGGACCGACTTACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCTGCAGTACTACGACTACTCTACACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCAGGCGCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGTGC
mAb 20562		
SEQ ID NO: 41	HCDR1 (Kabat)	DYAMS
SEQ ID NO: 42	HCDR2 (Kabat)	VIEGDASYTHYADSVRG
SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Kabat)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Chothia)	EGDASY
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Chothia)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 47	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIEGDASYTHYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTYSSAFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 48	DNA VH	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGACTACGCTATGAGCTGGGTGACACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGACGCTGATCGAGGGCGACGCTAGTTACACTCACTACGCCGATAGCGTCAGAGGCCGGTTCATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGTCTACTGCGCTAGAGAGCGGACCTACTCTAGCGCCTTCGACTACTGGGTCAGGGCACCTGGTCAACGCTGTCTAGC
SEQ ID NO: 49	重鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIEGDASYTHYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTYSSAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

		WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO: 50	DNA重鏈	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGCGGACTGGTGC AGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGT GGCTTCACCTTTAGCGACTACGCTATGAGCTGGGTCAG ACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTACGCGTG ATCGAGGGCGACGCTAGTTACACTACTACGCCGATA GCGTCAGAGGCCGGTTCCTACTATCTCTAGGGATAACTCT AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCG GACCTACTCTAGCGCCTTCGACTACTGGGGTCAGGGCA CCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCA AGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAAGTGTGCCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACT ACTTCCCCGAGCCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGG GCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG ACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAAGTGTGGGA GGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGC GTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGC CAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCAGTGC TGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT TCAGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 51	LCDR1 (Kabat)	RASQDISSDLN
SEQ ID NO: 52	LCDR2 (Kabat)	DASNLQS
SEQ ID NO: 53	LCDR3 (Kabat)	QQHYSPSHT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Chothia)	SQDISSD
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Chothia)	HYSPSH
SEQ ID NO: 57	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSDLNHWYQQKP GKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQHYSPSHTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 58	DNA VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGC TAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCT CTCAGGATATCTCTAGCGACCTGAACTGGTATCAGCAG AAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACG CCTCTAACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC GGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTC TAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGCACTATAGCCCTAGTCACACCTTCGGTCAGGGC ACTAAGGTTCGAGATTAAAG
SEQ ID NO: 59	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSDLNHWYQQKP GKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQHYSPSHTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 60	DNA輕鏈	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGC TAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCT CTCAGGATATCTCTAGCGACCTGAACTGGTATCAGCAG

		AAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACG CCTCTAACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC GGTAGCGGTAGTGGACCGACTTCACCCTGACTATCTC TAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGCACTATAGCCCTAGTCACACCTTCGGTCAGGGC ACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATT CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACAGGGCC TGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
mAb 20811		
SEQ ID NO: 61	HCDR1 (Kabat)	DYAMS
SEQ ID NO: 62	HCDR2 (Kabat)	TIEGDSNYIEYADSVKG
SEQ ID NO: 63	HCDR3 (Kabat)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 64	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 65	HCDR2 (Chothia)	EGDSNY
SEQ ID NO: 66	HCDR3 (Chothia)	ERTYSSAFDY
SEQ ID NO: 67	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKGLEWVSTIEGDSNYIEYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTYSSAFDYWGQGLT VSS
SEQ ID NO: 68	DNA VH	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGC AGCCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTC CGGATTCACCTTTTCTGACTACGCTATGTCTTGGGTGC GCCAGGCCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCACT ATCGAAGGTGACAGCAACTACATCGAATATGCGGATA GCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTG CGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAACGT ACTTACTCTTCTGCTTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCAC CCTGGTGAAGTGTAGCTCA
SEQ ID NO: 69	重鏈	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKGLEWVSTIEGDSNYIEYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTYSSAFDYWGQGLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVQLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 70	DNA重鏈	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGC AGCCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTC CGGATTCACCTTTTCTGACTACGCTATGTCTTGGGTGC GCCAGGCCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCACT ATCGAAGGTGACAGCAACTACATCGAATATGCGGATA GCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTG CGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAACGT ACTTACTCTTCTGCTTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCAC CCTGGTGAAGTGTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACACTCAGG GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTCT ACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG

		GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 71 (Kabat)	LCDR1	RASQDISSDLN
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR2	DASNLQS
SEQ ID NO: 73 (Kabat)	LCDR3	HQWYSTLYT
SEQ ID NO: 74 (Chothia)	LCDR1	SQDISSD
SEQ ID NO: 75 (Chothia)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 76 (Chothia)	LCDR3	WYSTLY
SEQ ID NO: 77	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSDLNHWYQQKP GKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCHQWYSTLYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 78	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGC CAGCCAGGACATTTCTTCTGACCTGAACTGGTACCAGC AGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGA CGTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTG CCATCAGTGGTACTCTACTCTGTACACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 79	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSDLNHWYQQKP GKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCHQWYSTLYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 80	DNA輕鏈	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGC CAGCCAGGACATTTCTTCTGACCTGAACTGGTACCAGC AGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGA CGTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTG CCATCAGTGGTACTCTACTCTGTACACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCCGCTCC CAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT GAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG CGAGTGT

mAb 12422		
SEQ ID NO: 81	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 82	HCDR2 (Kabat)	YISPYMGETHYAQKFQG
SEQ ID NO: 83	HCDR3 (Kabat)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 84	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 85	HCDR2 (Chothia)	SPYMGE
SEQ ID NO: 86	HCDR3 (Chothia)	ESYEYFDI
SEQ ID NO: 87	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGYISPYMGETHYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARESYEYFDIWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 88	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAA AACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCATC CGGAGGGACGTTTAGCAGCTATGCGATTAGCTGGGTG CGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCT ACATCTCTCCGTACATGGGCGAAACTCATTACGCCAG AAATTTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTACGAGCAGCCTGCG CAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAT CTTACGAATACTTCGACATCTGGGGCCAAGGCACCCTG GTGACTGTAGCTCA
SEQ ID NO: 89	重鏈	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGYISPYMGETHYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARESYEYFDIWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 90	DNA重鏈	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAA AACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCATC CGGAGGGACGTTTAGCAGCTATGCGATTAGCTGGGTG CGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCT ACATCTCTCCGTACATGGGCGAAACTCATTACGCCAG AAATTTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTACGAGCAGCCTGCG CAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAT CTTACGAATACTTCGACATCTGGGGCCAAGGCACCCTG GTGACTGTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCCGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACACACA TGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGTCTCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAACCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGGGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG

		CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 91 (Kabat)	LCDR1	RASQISNDLA
SEQ ID NO: 92 (Kabat)	LCDR2	ATSILQS
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	LCDR3	LQYYDYSYT
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	LCDR1	SQISND
SEQ ID NO: 95 (Chothia)	LCDR2	ATS
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	LCDR3	YYDYSY
SEQ ID NO: 97	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYATSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCLQYYDYSYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 98	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGC CAGCCAGTCTATTTCTAACGACCTGGCTTGGTACCAGC AGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGC TACTTCTATCCTGCAAAGCGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTG CCTGCAGTACTACGACTACTCTTACACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 99	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYATSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCLQYYDYSYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 100	DNA輕鏈	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGC CAGCCAGTCTATTTCTAACGACCTGGCTTGGTACCAGC AGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGC TACTTCTATCCTGCAAAGCGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTG CCTGCAGTACTACGACTACTCTTACACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGCCGCTCC CAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT GAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG CGAGTGT
mAb 12439		
SEQ ID NO: 101	HCDR1 (Kabat)	SYDIS
SEQ ID NO: 102	HCDR2 (Kabat)	WINPYNGGTNYAQKFQG
SEQ ID NO: 103	HCDR3 (Kabat)	EGSGMIVYPGWSYAFDY
SEQ ID NO: 104	HCDR1 (Chothia)	GYTFTSY
SEQ ID NO: 105	HCDR2 (Chothia)	NPYNGG
SEQ ID NO: 106	HCDR3 (Chothia)	EGSGMIVYPGWSYAFDY
SEQ ID NO: 107	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDISWVR QAPGQGLEWMGWINPYNGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSRLEDTAIVYYCAREGSGMIVYPGWSYAFD YWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 108	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAA AACCGGGTGCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTC CGGATATACCTTCACTTCTTACGACATCTCTTGGGTGC

		GCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTG GATCAACCCGTACAACGGCGGTACGAACACGCGCAG AAATTTCAAGGCGCGGTGACCATGACCCGTGATACCA GCATTAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCCGTCTGCGT AGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAG GTTCTGGTATGATCGTTTACCCGGGTTGGTCTTACGCTT TCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAAGTGTAGC TCA
SEQ ID NO: 109	重鏈	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDISWVR QAPGQGLEWMGWINPYNGGTNYAQKFQGRVTMRDTSI STAYMELSRLEDYAVYYCAREGSGMIVYPGWSYAFD YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 110	DNA重鏈	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCGGAAGTGA AACCAGGCGCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAGCGTC CGGATATACCTTCACTTCTTACGACATCTCTGGGTGC GCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTG GATCAACCCGTACAACGGCGGTACGAACACGCGCAG AAATTTCAAGGCGCGGTGACCATGACCCGTGATACCA GCATTAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCCGTCTGCGT AGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAG GTTCTGGTATGATCGTTTACCCGGGTTGGTCTTACGCTT TCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAAGTGTAGC TCAGCCTCCACCAAGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT CTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACG CGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTA
SEQ ID NO: 111 (Kabat)	LCDR1	RASQDISNDLG
SEQ ID NO: 112 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 113 (Kabat)	LCDR3	QQHYHTPNT
SEQ ID NO: 114 (Chothia)	LCDR1	SQDISND
SEQ ID NO: 115	LCDR2	AAS

(Chothia)		
SEQ ID NO: 116 (Chothia)	LCDR3	HYHTPN
SEQ ID NO: 117	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNDLGWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQHYHTPNTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 118	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGC CAGCCAGGACATTTCTAACGACCTGGGTTGGTACCAGC AGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGC TGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTG CCAGCAGCATTACCATACTCCGAACACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 119	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNDLGWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQHYHTPNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 120	DNA輕鏈	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGC CAGCCAGGACATTTCTAACGACCTGGGTTGGTACCAGC AGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGC TGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTG CCAGCAGCATTACCATACTCCGAACACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCCGCTCC CAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT GAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG CGAGTGT

本發明之其他抗體包括其中胺基酸或編碼胺基酸之核酸已突變、然而與表1所述序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%一致性的抗體。在一些實施例中，其包括突變型胺基酸序列，其中與表1所述序列中所描繪之可變區相比，可變區中不超過1、2、3、4或5個胺基酸已突變，然而保持實質上相同的治療活性。

因為此等抗體中之每一者可結合至FGFR2/4，所以VH、VL、全長輕鏈及全長重鏈序列(胺基酸序列及編碼胺基酸序列之核苷酸序列)可「混合搭配」而產生本發明之其他FGFR2/4結合抗體。此等「混合搭配」FGFR2/4結合抗體可使用此項技術中已知的結合分析(例如

ELISA、及實例章節中所述之其他分析)加以測試。當此等鏈混合搭配時，特定VH/VL對中之VH序列應置換為結構類似之VH序列。同樣，特定全長重鏈/全長輕鏈對中之全長重鏈序列應置換為結構類似之全長重鏈序列。同樣，特定VH/VL對中之VL序列應置換為結構類似之VL序列。同樣，特定全長重鏈/全長輕鏈對中之全長輕鏈序列應置換為結構類似之全長輕鏈序列。因此，在一個態樣中，本發明提供分離的單株抗體或其抗原結合區，其具有：重鏈可變區，包含選自由SEQ ID NO: 7、27、47、67、87及107組成之群之胺基酸序列；及輕鏈可變區，包含選自由SEQ ID NO: 17、37、57、77、97及117組成之群的胺基酸序列；其中該抗體特異性結合至FGFR2/4。

在另一個態樣中，本發明提供(i)分離的單株抗體，其具有：全長重鏈，包含已根據在哺乳動物細胞中之表現加以最佳化的胺基酸序列，該胺基酸序列選自由SEQ ID NO: 9、29、49、69、89及109組成之群；及全長輕鏈，包含已根據在哺乳動物細胞中之表現加以最佳化的胺基酸序列，該胺基酸序列選自由SEQ ID NO: 19、39、59、79、99及119組成之群；或(ii)包含其抗原結合部分的功能蛋白。

在另一個態樣中，本發明提供FGFR2/4結合抗體，其包含表1所述之重鏈及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3或其組合。抗體之VH CDR1之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 1、21、41、61、81及101。抗體之VH CDR2之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 2、22、42、62、82及102。抗體之VH CDR3之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 3、23、43、63、83及103。抗體之VL CDR1之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 11、31、51、71、91及111。抗體之VL CDR2之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 12、32、52、72、92及112。抗體之VL CDR3之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 13、33、53、73、93及113。

假定該等抗體中之每一者可結合至FGFR2/4且抗原結合特異性主

要由CDR1、2及3區提供，則VH CDR1、2及3序列及VL CDR1、2及3序列可「混合搭配」(亦即，不同抗體之CDR可混合搭配)，但各抗體必須含有VH CDR1、2及3及VL CDR1、2及3，以產生本發明之其他C5結合分子。此等「混合搭配」FGFR2/4結合抗體可使用此項技術中已知的結合分析及實例中所述的分析(例如ELISA)加以測試。當VH CDR序列混合搭配時，來自特定VH序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應置換為結構類似之CDR序列。同樣，當VL CDR序列混合搭配時，來自特定VL序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應置換為結構類似之CDR序列。一般熟習此項技術者顯而易知，新穎VH及VL序列可藉由以在結構上與本文中針對本發明單株抗體所示之CDR序列類似的序列取代一或多個VH及/或VL CDR區序列而產生。

因此，本發明提供分離的單株抗體或其抗原結合區，其包含：重鏈CDR1，包含選自由SEQ ID NO: 1、21、41、61、81及101組成之群的胺基酸序列；重鏈CDR2，包含選自由SEQ ID NO: 2、22、42、62、82及102組成之群的胺基酸序列；重鏈CDR3，包含選自由SEQ ID NO: 3、23、43、63、83及103組成之群的胺基酸序列；輕鏈CDR1，包含選自由SEQ ID NO: 11、31、51、71、91及111組成之群的胺基酸序列；輕鏈CDR2，包含選自由SEQ ID NO: 12、32、52、72、92及112組成之群的胺基酸序列；及輕鏈CDR3，包含選自由SEQ ID NO: 13、33、53、73、93及113組成之群的胺基酸序列；其中該抗體特異性結合FGFR2/4。

在一個特定實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有SEQ ID NO: 1之重鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 2之重鏈CDR2、具有SEQ ID NO: 3之重鏈CDR3、具有SEQ ID NO: 11之輕鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 12之輕鏈CDR2及具有SEQ ID NO: 13之輕鏈CDR3。

在一個特定實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有SEQ ID NO: 21之重鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 22之重鏈CDR2、具有SEQ ID NO: 23之重鏈CDR3、具有SEQ ID NO: 31之輕鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 32之輕鏈CDR2及具有SEQ ID NO: 33之輕鏈CDR3。

在一個特定實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有SEQ ID NO: 41之重鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 42之重鏈CDR2、具有SEQ ID NO: 43之重鏈CDR3、具有SEQ ID NO: 51之輕鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 52之輕鏈CDR2及具有SEQ ID NO: 53之輕鏈CDR3。

在一個特定實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有SEQ ID NO: 61之重鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 62之重鏈CDR2、具有SEQ ID NO: 63之重鏈CDR3、具有SEQ ID NO: 71之輕鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 72之輕鏈CDR2及具有SEQ ID NO: 73之輕鏈CDR3。

在一個特定實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有SEQ ID NO: 81之重鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 82之重鏈CDR2、具有SEQ ID NO: 83之重鏈CDR3、具有SEQ ID NO: 91之輕鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 92之輕鏈CDR2及具有SEQ ID NO: 93之輕鏈CDR3。

在一個特定實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有SEQ ID NO: 101之重鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 102之重鏈CDR2、具有SEQ ID NO: 103之重鏈CDR3、具有SEQ ID NO: 111之輕鏈CDR1、具有SEQ ID NO: 112之輕鏈CDR2及具有SEQ ID NO: 113之輕鏈CDR3。

在某些實施例中，特異性結合至FGFR2/4的抗體為表1中所述的

抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)。

1. 鑑別抗原決定基及結合至相同抗原決定基的抗體

在一個實施例中，本發明提供特異性結合至人類FGFR2上之抗原決定基的抗體或抗原結合片段，該抗原決定基包含SEQ ID NO: 137之胺基酸176 (Lys)及210 (Arg)。在一些態樣中，本發明提供抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，其特異性結合人類FGFR2之以下位置上的胺基酸：173 (Asn)、174 (Thr)、175 (Val)、176 (Lys)、178 (Arg)、208 (Lys)、209 (Val)、210 (Arg)、212 (Gln)、213 (His)、217 (Ile)及219 (Glu)，如SEQ ID NO: 137中所示。

在一個實施例中，本發明提供抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)，其結合至人類FGFR2之胺基酸160-189 (KMEKRLHAVPAANTVKFRCPPAGGNPMPTMR；SEQ ID NO: 136)及/或胺基酸198-216 (KMEKRLHAVPAANTVKFRC；SEQ ID NO: 141)的抗原決定基(根據P21802-3編號；SEQ ID NO: 137)。

在一個實施例中，本發明提供特異性結合至人類FGFR4上之抗原決定基的抗體或抗原結合片段，該抗原決定基包含SEQ ID NO: 142之胺基酸169 (Lys)及203 (Arg)。在一些態樣中，本發明提供抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，其特異性結合人類FGFR4之以下位置上的胺基酸：150 (Thr)、151 (His)、154 (Arg)、157 (Lys)、160 (His)、166 (Asn)、167 (Thr)、168 (Val)、169 (Lys)、171 (Arg)、173 (Pro)、174 (Ala)、201 (Arg)、202 (Leu)、203 (Arg)、204 (His)、205 (Gln)、206 (His)、207 (Trp)、210 (Val)及212 (Glu)，如SEQ ID NO: 142中所示。

在一個實施例中，本發明提供抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)，其結合至人類FGFR4之胺基酸150-174 (THPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPA；SEQ ID NO: 132)及/或胺基酸201-212 (RLRHQHWSLVME；SEQ ID

NO: 133)的抗原決定基(根據P22455-1編號；SEQ ID NO: 142)。

在一個實施例中，本發明提供抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，其特異性結合至人類FGFR2上之包含SEQ ID NO: 137之胺基酸176 (Lys)及210 (Arg)的抗原決定基且特異性結合至人類FGFR4上之包含SEQ ID NO: 142之胺基酸169 (Lys)及203 (Arg)的抗原決定基。

在一個實施例中，本發明提供抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)，其結合至人類FGFR2之具有胺基酸160-189 (KMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPTMR；SEQ ID NO: 136)及胺基酸198-216 (KMEKRLHAVPAANTVKFRC；SEQ ID NO: 141)的抗原決定基(根據p21802-3編號；SEQ ID NO: 137)以及人類FGFR4之具有胺基酸150-174 (THPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPA；SEQ ID NO: 132)及胺基酸201-212 (RLRHQHWSLVME；SEQ ID NO: 133)的抗原決定基(根據P22455-1編號；SEQ ID NO: 142)

本發明亦提供抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)，其特異性結合至與表1中所述之抗FGFR2/4抗體相同的抗原決定基，或與表1中所述之抗體交叉競爭。其他抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)因此可在FGFR2及/或FGFR4結合分析中根據其與本發明之其他抗體交叉競爭(例如以統計上顯著的方式競爭性地抑制本發明其他抗體之結合)的能力加以鑑別。測試抗體能夠抑制本發明之抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)結合至FGFR2及/或FGFR4蛋白(例如人類FGFR2及/或FGFR4)證明，測試抗體可與彼抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)競爭結合至FGFR2及/或FGFR4；根據非限制理論，此抗體結合至FGFR2及/或FGFR4蛋白上的抗原決定基與其所競爭之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)相同或相關(例如在結構上類似或在空間上鄰近)。在某些實施例中，結合至FGFR2及/或FGFR4上之抗原決定基與表1中所述抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)相同的抗體為人類或

人類化單株抗體。此人類或人類化單株抗體可如本文所述製備及分離。

2. Fc區構架之進一步改變

本發明之免疫結合物可包含經修飾抗體或其抗原結合片段，其進一步包含例如位於VH及/或VL內的構架殘基修飾，以改良抗體特性。在一些實施例中，達成構架修飾以降低抗體免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「回復突變」為相應生殖系序列。更特定言之，已經歷體細胞突變之抗體可含有與該抗體所來源之生殖系序列不同的構架殘基。此等殘基可藉由將抗體構架序列與由該抗體所來源之生殖系序列相比較來鑑別。為使構架區序列恢復其生殖系組態，體細胞突變可藉由例如定點誘變法「回復突變」為生殖系序列。本發明亦欲包涵此等「回復突變」抗體。

另一類型之構架修飾包括使構架區內或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變以移除T細胞抗原決定基，由此降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為「去免疫」，且進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第20030153043號中。

除在構架區或CDR區內達成修飾之外，或作為其替代方案，本發明之抗體可經工程化以包括Fc區內之修飾，典型地以改變抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如可使一或多個化學部分連接至抗體)或經修飾以改變其糖基化，以再次改變抗體之一或多種功能特性。下文進一步詳細描述此等實施例中之每一者。

在一個實施例中，CH1之鉸鏈區經修飾以使得該鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數得以改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1之鉸鏈區中之半胱胺酸

殘基數經改變以例如有利於輕鏈及重鏈之組裝或增強或降低抗體之穩定性。

在另一個實施例中，抗體之Fc鉸鏈區經突變以縮短抗體之生物半衰期。更特定言之，將一或多種胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區中，以使得抗體對葡萄球菌蛋白A (SpA)的結合相對於原生Fc鉸鏈域SpA結合而言減弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在其他實施例中，Fc係藉由其中至少一個胺基酸殘基經不同胺基酸殘基置換而改變，以改變抗體之效應功能。舉例而言，一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換，以使得抗體對效應配位體具有改變之親和力，但保持親本抗體之抗原結合能力。親和力改變之效應配位體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法描述於例如Winter等人之美國專利第5,624,821號與第5,648,260號中。

在另一個實施例中，一或多個選自胺基酸殘基的胺基酸可經不同胺基酸殘基置換，以使得抗體具有改變之C1q結合及/或降低或消除之補體依賴細胞毒性(CDC)。此方法描述於例如Idusogie等人之美國專利第6,194,551號中。

在另一個實施例中，一或多個胺基酸殘基經改變以藉此改變抗體結合補體之能力。此方法描述於例如Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351中。在一個特定實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段中的一或多個胺基酸置換為一或多個異型胺基酸殘基，諸如圖4中針對IgG1子類及κ同型所示之胺基酸殘基。異型胺基酸殘基亦包括(但不限於) IgG1、IgG2及IgG3子類之重鏈之恆定區以及κ同型之輕鏈之恆定區，如Jefferis等人, MAbs. 1:332-338 (2009)所述。

在又一個實施例中，藉由修飾一或多個胺基酸來修飾Fc區，以增強抗體介導抗體依賴細胞毒性(ADCC)之能力及/或增強抗體對Fcγ

受體之親和力。此方法描述於例如Presta之PCT公開案WO 00/42072中。此外，人類IgG1上之針對FcγRI、FcγRII、FcγRIII及FcRn的結合位點已定位，且結合改良的變異體已有描述(參見Shields等人，J.Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001)。

在又一實施例中，修飾抗體之糖基化。舉例而言，可製備去糖基化抗體(亦即，抗體缺乏糖基化)。糖基化可經改變以例如增強抗體對「抗原」之親和力。可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖化位點來達成該等碳水化合物修飾。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，從而消除一或多個可變區構架糖基化位點，藉此消除彼位點之糖基化。此去糖基化作用可增強抗體對抗原之親和力。此方法描述於Co等人之美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中。

另外或可替代地，可使得抗體具有改變的糖基化類型，諸如海藻糖基殘基量降低之低海藻糖基化抗體或二分GlcNac結構增加之抗體。已證明該等改變之糖基化模式將增強抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由例如以糖基化機構改變之宿主細胞表現抗體來達成。糖基化機構改變之細胞已描述於此項技術中且可用作表現本發明之重組抗體的宿主細胞，藉此產生糖基化改變之抗體。舉例而言，Hang等人之EP 1,176,195描述一種細胞株，其具有在功能上已擾亂之FUT8基因，該基因編碼海藻糖基轉移酶，使得該細胞株所表現之抗體展現低海藻糖基化。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述一種變異CHO細胞株(Lec13細胞)，其使海藻糖連接至Asn(297)所連碳水化合物之能力降低，亦使得彼宿主細胞所表現之抗體出現低海藻糖基化(亦參見Shields等人，(2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述經工程化以表現糖蛋白修飾型糖基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N-乙醯基葡萄糖胺轉移酶III (GnTIII))的細胞株，使得工程化細胞株所表現之抗體展現增加之二分GlcNac結構，由此使

得抗體之ADCC活性增強(亦參見Umana等人，Nat. Biotech. 17:176-180, 1999)。

在另一個實施例中，抗體經修飾以延長其生物半衰期。多種方法可行。舉例而言，可引入一或多個以下突變：T252L、T254S、T256F，如Ward之美國專利第6,277,375號中所述。或者，為了延長生物半衰期，可改變抗體的CH1或CL區以含有取自IgG之Fc區之CH2域之兩個環的補救受體結合抗原決定基，如Presta等人之美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

3. 製備FGFR2/4抗體

抗FGFR2/4抗體及其抗體片段(例如抗原結合片段)可此項技術中已知的任何方式製備，包括(但不限於)重組表現、化學合成、及酶促消化抗體四聚體，而全長單株抗體可藉由例如融合瘤或重組產生來獲得。重組表現可利用此項技術中已知的任何適當宿主細胞，例如哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆蟲宿主細胞等。

本發明進一步提供編碼本文所述抗體的聚核苷酸，例如編碼包含本文所述互補決定區之重鏈或輕鏈可變區或區段的聚核苷酸。在一些實施例中，編碼重鏈可變區之聚核苷酸與選自由SEQ ID NO: 8、28、48、68、88及108組成之群的聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。在一些實施例中，編碼輕鏈可變區之聚核苷酸與選自由SEQ ID NO: 18、38、58、78、98及118組成之群的聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。

在一些實施例中，編碼重鏈之聚核苷酸與SEQ ID NO: 10、30、50、70、90或110之聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一

致性。在一些實施例中，編碼輕鏈之聚核苷酸與SEQ ID NO: 20、40、60、80、100或120之聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。

本發明之聚核苷酸僅可編碼抗FGFR2/4抗體之可變區序列。其亦可編碼抗體之可變區與恆定區。一些聚核苷酸序列編碼包含例示性小鼠抗FGFR2及/或FGFR4抗體之一之重鏈與輕鏈之可變區的多肽。一些其他聚核苷酸編碼兩個分別與小鼠抗體之一之重鏈及輕鏈之可變區實質上一致的多肽區段。

聚核苷酸序列可藉由重新(de novo)固相DNA合成或藉由對編碼抗FGFR2/4抗體或其結合片段之現有序列(例如如下文實例中所述之序列)進行PCR突變誘發來製備。直接化學合成核酸可藉由此項技術中已知的方法達成，諸如Narang等人之磷酸三酯方法(Meth. Enzymol. 68:90, 1979)；Brown等人之磷酸二酯方法(Meth. Enzymol. 68:109, 1979)；Beaucage等人之胺基磷酸二乙酯方法(Tetra. Lett., 22:1859, 1981)；及美國專利第4,458,066號之固體支撐物方法。藉由PCR將突變引入聚核苷酸序列中可如以下文獻中所述進行：例如 PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (編), Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis等人 (編), Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila等人, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991；及Eckert等人, PCR Methods and Applications 1:17, 1991。

本發明亦提供表現載體及宿主細胞用於製備上述抗FGFR2/4抗體。各種表現載體可用於表現編碼抗FGFR2/4抗體鏈或結合片段的聚核苷酸。基於病毒之表現載體與非病毒表現載體可用於在哺乳動物宿主細胞中產生抗體。非病毒載體及系統包括質體、典型地具有用於表

現蛋白質或RNA之表現卡匣的游離型載體，及人類人工染色體(參見例如Harrington等人，*Nat Genet* 15:345, 1997)。舉例而言，適用於哺乳動物(例如人類)細胞表現抗FGFR2/4聚核苷酸及多肽的非病毒載體包括pThioHis A、pThioHis B及pThioHis C、pcDNATM3.1/His、pEBVHis A、pEBVHis B及pEBVHis C (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV載體及此項技術中已知用於表現其他蛋白質的諸多其他載體。適用之病毒載體包括基於逆轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒之載體；基於SV40、乳頭狀瘤病毒、HBP EB病毒(HBP Epstein Barr virus)之載體；痘瘡病毒載體勝利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV)載體。參見Brent等人，前述；Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995；及Rosenfeld等人，*Cell* 68:143, 1992。

表現載體之選擇視載體欲表現於其中之指定宿主細胞而定。表現載體典型地含有可操作地連接至編碼抗FGFR2/4抗體鏈或片段之聚核苷酸的啟動子及其他調節序列(例如增強子)。在一些實施例中，誘導性啟動子用於防止所插入序列表現，除在誘導條件下之外。誘導性啟動子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金屬硫蛋白啟動子或熱休克啟動子。所轉型生物體之培養物可在不偏向編碼序列之群體的非誘導條件下擴增，該等編碼序列之表現產物可被宿主細胞良好地耐受。除啟動子之外，抗FGFR2/4抗體鏈或片段之有效表現亦可能必需或需要其他調節元件。此等元件典型地包括ATG起始密碼子及相鄰核糖體結合位點或其他序列。另外，表現效率可藉由包含適於在用細胞系統之增強子來增強(參見例如Scharf等人，*Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994；及Bittner等人，*Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987)。舉例而言，SV40增強子或CMV增強子可用於增強哺乳動物宿主細胞中之表現。

表現載體亦可提供分泌信號序列位置以與所插入抗FGFR2/4抗體序列編碼的多肽形成融合蛋白。更通常，所插入抗FGFR2/4抗體序列

連接至信號序列，隨後包含於載體中。用於接收編碼抗FGFR2/4抗體輕鏈及重鏈可變域之序列的載體有時亦編碼恆定區或其一部分。該等載體允許可變區與恆定區以融合蛋白形式進行表現，藉此產生完整抗體或其片段。該等恆定區典型地為人類恆定區。

用於接收及表現抗FGFR2/4抗體鏈的宿主細胞可為原核或真核生物細胞。大腸桿菌為一種適用於選殖及表現本發明聚核苷酸的原核生物宿主。其他適用之微生物宿主包括桿菌屬，諸如枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)；及其他腸內菌科，諸如沙門氏菌屬(*Salmonella*)、沙雷氏菌屬(*Serratia*)；及各種假單胞菌種。在此等原核生物宿主中，亦可產生表現載體，其典型地含有與宿主細胞相容之表現控制序列(例如複製起點)。另外，存在許多各種熟知啟動子，諸如乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統、 β -內醯胺酶啟動子系統，或噬菌體 λ 之啟動子系統。啟動子典型地控制表現(視情況與操縱序列一起)，且具有用於起始及完成轉錄及轉譯的核糖體結合位點序列及其類似序列。亦可使用其他微生物(諸如酵母)表現本發明之抗FGFR2/4多肽。亦可將昆蟲細胞與桿狀病毒載體組合使用。

在一些較佳實施例中，哺乳動物宿主細胞用於表現及產生本發明之抗FGFR2/4多肽。舉例而言，其可為表現內源免疫球蛋白基因之融合瘤細胞株(例如骨髓瘤融合瘤純系，如實例中所述)或含有外源表現載體之哺乳動物細胞株(例如下文例示之SP2/0骨髓瘤細胞)。該等細胞包括任何正常短命或正常或異常永生動物或人類細胞。舉例而言，已開發出能夠分泌完整免疫球蛋白之許多適合宿主細胞株，包括CHO細胞株、各種Cos細胞株、希拉細胞(HeLa cell)、骨髓瘤細胞株、轉型之B細胞及融合瘤。表現多肽之哺乳動物組織細胞培養物的使用一般性論述於例如Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987。用於哺乳動物宿主細胞的表現載體可包括表現控制

序列，諸如複製起點、啟動子及增強子(參見例如 Queen 等人, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986)，及必需的加工資訊位點，諸如核糖體結合位點、RNA 拼接位點、多腺苷酸化位點及轉錄終止子序列。該等表現載體通常含有來源於哺乳動物基因或哺乳動物病毒之啟動子。適合啟動子可為組成性啟動子、細胞型特異性啟動子、階段特異性啟動子及/或可調節或可調控啟動子。適用啟動子包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、組成性腺病毒主要晚期啟動子、地塞米松(dexamethasone)誘導性 MMTV 啟動子、SV40 啟動子、MRP polIII 啟動子、組成性 MPSV 啟動子、四環素(tetracycline)誘導性 CMV 啟動子(諸如人類立即早期 CMV 啟動子)、組成性 CMV 啟動子及此項技術中已知之啟動子-增強子組合。

引入含有所關注之聚核苷酸序列之表現載體的方法視細胞宿主之類型而變化。舉例而言，原核細胞通常使用氯化鈣轉染，而其他細胞宿主可使用磷酸鈣處理或電穿孔(一般參見 Sambrook 等人，前述)。其他方法包括例如電穿孔、磷酸鈣處理、脂質體介導之轉型、注射及微注射、衝擊法、病毒體、免疫脂質體、多價陽離子:核酸結合物、裸 DNA、人工病毒粒子、融合至疱疹病毒結構蛋白 VP22 (Elliot 及 O'Hare, Cell 88:223, 1997)、藥劑增強之 DNA 吸收及離體轉導。對於長期高產量生產重組蛋白而言，通常需要穩定表現。舉例而言，穩定表現抗 FGFR2 及/或 FGFR4 抗體鏈或結合片段的細胞株可使用本發明之表現載體製備，本發明之表現載體含有病毒性複製起點或內源性表現元件及可選標記基因。引入載體之後，可允許細胞在強化培養基中生長 1 至 2 天，隨後將其轉入選擇性培養基中。可選擇標記之目的為賦予抗選擇性，且其存在允許成功表現所引入序列的細胞在選擇性培養基中生長。穩定轉染之抗性細胞可使用適合於該細胞類型之組織培養技術增殖。

治療及診斷用途

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物適用於多種應用，包括(但不限於)治療癌症，諸如實體癌症。在某些實施例中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物適用於抑制腫瘤生長、誘導分化、減小腫瘤體積及/或降低腫瘤之腫瘤發生。使用方法可為活體外、離體或活體內方法。

在一個態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物適用於偵測生物樣品中FGFR2或FGFR4之存在。如本文所用，術語「偵測」包涵定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織。在某些實施例中，此等組織包括表現FGFR2或FGFR4之量高於其他組織的正常及/或癌變組織。

在一個態樣中，本發明提供一種偵測生物樣品中FGFR2或FGFR4之存在的方法。在某些實施例中，方法包含使生物樣品與抗FGFR2/4抗體在容許抗體結合至抗原的條件下接觸，及偵測抗體與抗原之間是否形成複合物。

在一個態樣中，本發明提供一種診斷與FGFR2或FGFR4之表現增強有關之病症的方法。在某些實施例中，方法包含：使測試細胞與抗FGFR2/4抗體接觸；藉由偵測抗FGFR2/4抗體與FGFR2或FGFR4抗原之結合來測定測試細胞表現FGFR2或FGFR4的量(定量或定性)；及對測試細胞表現FGFR2或FGFR4的量與對照細胞(例如組織來源與測試細胞相同之正常細胞或表現FGFR2或FGFR4之量與此正常細胞類似之細胞)表現FGFR2或FGFR4的量進行比較，其中測試細胞表現FGFR2或FGFR4的量高於對照細胞指示存在與FGFR2或FGFR4之表現增強有關的病症。在某些實施例中，測試細胞獲自懷疑患有與FGFR2或FGFR4之表現增強有關之病症的個體。在某些實施例中，病症為細胞增殖病症，諸如癌症或腫瘤。在某些實施例中，方法包含量測測試細

胞中FGFR2基因之複本數。在某些實施例中，方法包含偵測PAX-FOXO易位突變。基因及/或易位突變之複本數可使用此項技術中已知的標準方法偵測，例如PCR、RTPCR等。

在某些實施例中，診斷或偵測方法(諸如上述方法)包含偵測抗FGFR2/4抗體與細胞表面上所表現之FGFR2或FGFR4的結合或與自表面上表現FGFR2或FGFR4之細胞所得之膜製劑中之FGFR2或FGFR4的結合。用於偵測抗FGFR2/4抗體與細胞表面上所表現之FGFR2或FGFR4之結合的例示性分析為「FACS」分析。

可利用某些其他方法偵測抗FGFR2/4抗體與FGFR2或FGFR4之結合。此等方法包括(但不限於)此項技術中熟知之抗原結合分析法，諸如西方墨點法、放射免疫分析法、ELISA(酶聯免疫吸附分析法)、「夾層」免疫分析法、免疫沈澱分析法、螢光免疫分析法、蛋白質A免疫分析法及免疫組織化學(IHC)。

在某些實施例中，抗FGFR2/4抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光標記、發色標記、電子緻密標記、化學發光標記及放射性標記)、以及間接偵測(例如經由酶促反應或分子相互作用)之部分(諸如酶或配位體)。

在某些實施例中，抗FGFR2/4抗體固著於不溶性基質上。固著需要使抗FGFR2/4抗體與溶液保持游離狀態之任何FGFR2或FGFR4蛋白分離。此分離習知如下達成：分析程序之前，使抗FGFR2/4抗體不溶解，如藉由吸附至水不溶性基質或表面(Bennich等人，美國專利第3,720,760號)，或藉由共價偶合(例如使用戊二醛交聯)；或在抗FGFR2/4抗體與FGFR2或FGFR4蛋白之間形成複合物之後，使抗FGFR2/4抗體不溶解，例如藉由免測沈澱法。

代替或除抗FGFR2/4抗體之外，可使用本發明之免疫結合物來實施診斷或偵測之任何上述實施例。

在一個實施例中，本發明提供一種治療或預防疾病的方法，包含向患者投與本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物。在某些實施例中，經本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物治療的疾病為癌症。可加以治療及/或預防之疾病之實例包括(但不限於)腎上腺皮質癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、中樞神經系統非典型性畸胎樣/桿狀腫瘤、結腸癌、結腸直腸癌、胚胎性瘤、子宮內膜癌、胃癌、頭頸癌、肝細胞癌、卡波氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、肝癌、非小細胞肺癌、直腸癌、橫紋肌肉瘤、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、鱗狀頸癌、胃癌、子宮癌、陰道癌、外陰癌。在某些實施例中，癌症的特徵為本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物結合至表現FGFR2或FGFR4之細胞。在某些實施例中，癌症的特徵為FGFR2或FGFR4之DNA複本數增加。在某些實施例中，癌症的特徵為FGFR2或FGFR4之表現增強，例如分別依據FGFR2或FGFR4 RNA之增加所度量。本發明提供治療癌症之方法，包含投與本發明之治療有效量之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物。在某些實施例中，癌症為實體癌症。在某些實施例中，個體為人類。在某些實施例中，癌症為抗藥性癌症及/或復發性癌症。在某些態樣中，例如，抗藥性癌症對酪胺酸激酶抑制劑具有抗性，包括(但不限於) EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制劑、IGFR抑制劑及Met抑制劑。在某些實施例中，癌症為Her2抗性癌症。

在某些實施例中，本發明提供抑制腫瘤生長的方法，包含向個體投與治療有效量之本發明抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物。在某些實施例中，個體為人類。在某些實施例中，個體患有腫瘤或腫瘤已移除。在某些實施例中，腫瘤對酪胺酸激酶抑制劑具有抗性，包括(但不限於) EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制

劑、IGFR抑制劑及Met抑制劑。

在某些實施例中，腫瘤表現與抗FGFR2/4抗體結合的FGFR2或FGFR4。在某些實施例中，腫瘤過度表現人類FGFR2或FGFR4。在某些實施例中，腫瘤中之FGFR2基因複本數增加。在某些實施例中，腫瘤具有引起FGFR4過度表現的PAX-FOXO易位突變。

本發明亦提供選擇患者接受本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物治療的方法，包含投與治療有效量之該等抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物。在某些態樣中，方法包含選擇患有酪胺酸激酶抑制劑抗性癌症的患者。在某些態樣中，預期酪胺酸激酶抑制劑抗性癌症對EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制劑、IGFR抑制劑及/或Met抑制劑具有抗性。在某些態樣中，預期抗性癌症為Her2抗性癌症。更特定言之，預期Her2抗性癌症對曲妥珠單抗(trastuzumab)或曲妥珠單抗恩坦辛(emtansine)無反應。在某些態樣中，預期癌症為原發抗藥性癌症，且在其他態樣中，預期癌症為復發性癌症，例如Her2復發性癌症。在本發明之某些態樣中，方法包含選擇患有原發抗藥性或復發性癌症之患者及量測FGFR2及/或FGFR4之表現。在某些態樣中，預期復發性癌症或腫瘤初始不為表現FGFR2或FGFR4之癌症或腫瘤，但變成FGFR2及/或FGFR4陽性癌症，其為酪胺酸激酶抑制劑(例如曲妥珠單抗或曲妥珠單抗恩坦辛)治療後的酪胺酸激酶抗性或復發性癌症或腫瘤。

對於治療疾病而言，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物的適當劑量視各種因素而定，諸如所治療疾病的類型、疾病的嚴重程度及病程、疾病之反應性、先前療法、患者病歷等。抗體或藥劑可一次性投與或在持續數日或數月之一系列治療期間投與，或直至達成治癒或達成疾病病況之減弱(例如腫瘤尺寸減小)。最佳給藥時程可利用患者體內之藥物累積量測結果計算且根據

個別抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物之相對效能而變化。在某些實施例中，劑量為每公斤體重0.01 mg至10 mg (例如0.01 mg、0.05 mg、0.1 mg、0.5 mg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、7 mg、8 mg、9 mg或10 mg)，且可每日、每週、每月或每年一次或多次給予。在某些實施例中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物每兩週給予一次或每三週給予一次。治療醫師可根據藥物在體液或組織中的所測滯留時間及濃度來估算重複給藥率。

組合療法

在某些情況下，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物與其他治療劑組合，諸如其他抗癌劑、抗過敏劑、抗噁心劑(或抗嘔吐劑)、疼痛舒解劑、細胞保護劑及其組合。

考慮供組合療法中使用的一般化學治療劑包括阿那曲唑(anastrozole) (Arimidex®)、比卡魯胺(bicalutamide) (Casodex®)、博萊黴素硫酸鹽(Blenoxane®)、白消安(busulfan) (Myleran®)、白消安注射劑(Busulfex®)、卡培他濱(capecitabine) (Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脫氧-5-氟胞苷、卡鉑(carboplatin) (Paraplatin®)、卡莫司汀(carmustine) (BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、順鉑(cisplatin) (Platinol®)、克拉屈濱(cladribine) (Leustatin®)、環磷醯胺(cyclophosphamide) (Cytosan® 或 Neosar®)、阿糖胞苷(cytarabine/cytosine arabinoside) (Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂質體注射劑(DepoCyt®)、達卡巴嗪(dacarbazine) (DTIC-Dome®)、放線菌素D(dactinomycin/Actinomycin D, Cosmegen®)、道諾黴素鹽酸鹽(Cerubidine®)、道諾黴素檸檬酸鹽脂質體注射劑(DaunoXome®)、地塞米松(dexamethasone)、多西他賽(docetaxel) (Taxotere®)、阿黴素鹽酸鹽(Adriamycin®, Rubex®)、依託泊苷(etoposide) (Vepesid®)、氟達

拉賓磷酸鹽 (fludarabine phosphate) (Fludara®)、5-氟尿嘧啶 (Atracil®, Efudex®)、氟他胺 (flutamide) (Eulexin®)、替紮他濱 (tezacitibine)、吉西他賓 (Gemcitabine) (二氟脫氧胞苷)、羥脲 (Hydrea®)、伊達比星 (Idarubicin) (Idamycin®)、異環磷醯胺 (ifosfamide) (IFEX®)、伊立替康 (irinotecan) (Camptosar®)、左天冬醯胺酶 (ELSPAR®)、亞葉酸鈣 (leucovorin calcium)、美法侖 (Alkeran®)、6-巰基嘌呤 (Purinethol®)、甲胺喋呤 (methotrexate) (Folex®)、米托蒽醌 (mitoxantrone) (Novantrone®)、麥羅塔 (mylotarg)、太平洋紫杉醇 (Taxol®)、殊品 (phoenix) (鉍 90/MX-DTPA)、噴司他丁 (pentostatin)、聚苯丙生 20 (polifeprosan 20) 與卡莫司汀 (carmustine) 植入物 (Gliadel®)、枸橼酸它莫西芬 (tamoxifen citrate) (Nolvadex®)、替尼泊苷 (teniposide) (Vumon®)、6-硫鳥嘌呤、噻替派、替拉紮明 (tirapazamine) (Tirazone®)、注射用之拓撲替康鹽酸鹽 (topotecan hydrochloride) (Hycamptin®)、長春鹼 (Velban®)、長春新鹼 (Oncovin®) 及長春瑞賓 (Navelbine®)。

在一個實施例中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物與具有抗癌特性之第二化合物組合成醫藥組合調配物，或給藥方案作為組合療法。醫藥組合調配物或給藥方案中之第二化合物可具有與該組合中之抗體或免疫結合物互補的活性，使得其彼此間不會產生不利的影響。舉例而言，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物可與(但不限於)以下組合：化學治療劑、酪胺酸激酶抑制劑、FGF下游信號傳導途徑抑制劑、IAP抑制劑、Bcl2抑制劑、Mcl1抑制劑及其他FGFR2抑制劑。

如本文所用，術語「醫藥組合」係指呈一種單位劑型之固定組合，或非固定組合或分裝部分之套組用於組合投藥，其中兩種或兩種以上治療劑可同時獨立地投與或在時間間隔內分別投與，特別是其中

此等時間間隔允許組合搭配物顯示協作效應，例如協同效應。

術語「組合療法」係指投與兩種或兩種以上治療劑以治療本發明所述之治療病狀或病症。此投藥包涵以實質上同時方式共投與此等治療劑，諸如以具有固定比率之活性成分的單一膠囊。或者，此投藥包涵各活性成分於多個或各別容器中共投與(例如膠囊、散劑及液體)。散劑及/或液體在投與之前可復原或稀釋至所要劑量。另外，此投藥亦包涵以依序方式大致同時或在不同時間使用各類型治療劑。在任一種情況下，治療方案提供藥物組合在治療本文所述病狀或病症方面的有益作用。

組合療法可提供「協同」且證實為「協同的」，亦即，一起使用活性成分時所達成之效應大於分別使用該等化合物所產生之效應的總和。當活性成分(1)共調配成組合之單位劑量調配物且同時投與或遞送時；(2)以各別調配物形式交替或並行遞送時；或(3)藉由一些其他方案遞送時，可獲得協同效應。當以交替療法遞送時，可在依序投與或遞送化合物(例如，藉由各別注射器中之不同注射劑)時達成協同效應。一般而言，在交替療法期間，依序(亦即連續)投與有效劑量之各活性成分，而在組合療法中，有效劑量之兩種或兩種以上活性成分一起投與。

在一個態樣中，本發明提供一種治療癌症的方法，係藉由將本發明之抗體藥物結合物與一或多種酪胺酸激酶抑制劑組合投與有需要之個體，酪胺酸激酶抑制劑包括(但不限於) EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制劑、IGFR抑制劑及Met抑制劑。

舉例而言，酪胺酸激酶抑制劑包括(但不限於)埃羅替尼鹽酸鹽(Erlotinib hydrochloride) (Tarceva®)；利尼伐尼(Linifanib) (N-[4-(3-胺基-1H-吡啶-4-基)苯基]-N'-(2-氟-5-甲基苯基)脲，亦稱為ABT 869，購自Genentech)；舒尼替尼蘋果酸鹽(Sunitinib malate) (Sutent®)；伯舒

替尼(Bosutinib) (4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基)胺基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基]喹啉-3-甲腈，亦稱為SKI-606，描述於美國專利第6,780,996號)；達沙替尼(Dasatinib) (Sprycel®)；帕唑帕尼(Pazopanib) (Votrient®)；索拉非尼(Sorafenib) (Nexavar®)；凡德他尼(Zactima) (ZD6474)；及伊馬替尼(Imatinib) (Imatinib)或伊馬替尼甲磺酸鹽(Gilvec®及Gleevec®)。

表皮生長因子受體(EGFR)抑制劑包括(但不限於)埃羅替尼鹽酸鹽(Tarceva®)、吉非替尼(Gefitinib) (Iressa®)；N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[[[(3"S)-四氫-3-呋喃基]氧基]-6-喹啉基]-4(二甲基胺基)-2-丁烯醯胺，Tovok®)；範得它尼(Vandetanib) (Caprelsa®)；拉帕替尼(Lapatinib) (Tykerb®)；(3R,4R)-4-胺基-1-((4-((3-甲氧基苯基)胺基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514)；卡奈替尼二鹽酸鹽(Canertinib dihydrochloride) (CI-1033)；6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788，CAS 497839-62-0)；木利替尼(Mubritinib) (TAK165)；貝利替尼(Pelitinib) (EKB569)；阿法替尼(Afatinib) (BIBW2992)；來那替尼(Neratinib) (HKI-272)；N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡啶-5-基]胺基]-5-甲基吡啶并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-胺基甲酸(3S)-3-嗎啉基甲酯(BMS599626)；N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[[(3 α ,5 β ,6 α)-八氫-2-甲基環戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹啉胺(XL647，CAS 781613-23-8)；及4-[4-[(1R)-1-苯基乙基]胺基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166，CAS 187724-61-4)。

EGFR抗體包括(但不限於)西妥昔單抗(Cetuximab) (Erbix®)；盤尼圖單抗(Panitumumab) (Vectibix®)；馬妥珠單抗(Matuzumab) (EMD-72000)；曲妥珠單抗(Trastuzumab) (Herceptin®)；尼妥珠單抗(Nimotuzumab) (hR3)；紫蘆木單抗(Zalutumumab)；TheraCIM h-

R3 ; MDX0447 (CAS 339151-96-1) ; 及 ch806 (mAb-806 , CAS 946414-09-1)。

人類表皮生長因子受體2 (Her2受體) (亦稱為Neu、ErbB-2、CD340或p185)抑制劑包括(但不限於)曲妥珠單抗(Herceptin®)；帕妥珠單抗(Omnitarg®)；曲妥珠單抗恩坦辛(Kadcyla®)；來那替尼(Neratinib) (HKI-272, (2E)-N-[4-[[3-氯-4-[(吡啶-2-基)甲氧基]苯基]胺基]-3-氟基-7-乙氧基喹啉-6-基]-4-(二甲基胺基)丁-2-烯醯胺，且描述於PCT公開案第WO 05/028443號中)；拉帕替尼(Lapatinib)或拉帕替尼二對甲苯磺酸鹽(Tykerb®)；(3R,4R)-4-胺基-1-((4-((3-甲氧基苯基)胺基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514)；(2E)-N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[[3-(3-呋喃基)氧基]-6-喹啉基]-4-(二甲基胺基)-2-丁烯醯胺(BIBW-2992, CAS 850140-72-6)；N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡啶-5-基]胺基]-5-甲基吡啶并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-胺基甲酸(3S)-3-嗎啉基甲酯(BMS 599626, CAS 714971-09-2)；卡奈替尼二鹽酸鹽(Canertinib dihydrochloride) (PD183805 或 CI-1033)；及 N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[3 α ,5 β ,6 α]-八氫-2-甲基環戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹啉胺(XL647, CAS781613-23-8)。

Her3抑制劑包括(但不限於) LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111及MEHD-7945A。

MET抑制劑包括(但不限於)卡博替尼(Cabozantinib) (XL184, CAS 849217-68-1)；氟雷替尼(Foretinib) (GSK1363089, 先前為XL880, CAS 849217-64-7)；體旺替尼(Tivantinib) (ARQ197, CAS 1000873-98-2)；1-(2-羥基-2-甲基丙基)-N-(5-(7-甲氧基喹啉-4-基氧基)吡啶-2-基)-5-甲基-3-側氧基-2-苯基-2,3-二氫-1H-吡啶-4-羰醯胺(AMG

458)；克里唑替尼(Cryzotinib) (Xalkori®, PF-02341066)；(3Z)-5-(2,3-二氫-1H-吡啶-1-基磺醯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亞甲基)-1,3-二氫-2H-吡啶-2-酮(SU11271)；(3Z)-N-(3-氯苯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亞甲基)-N-甲基-2-側氧基吡啶-5-磺醯胺(SU11274)；(3Z)-N-(3-氯苯基)-3-{{3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基}亞甲基}-N-甲基-2-側氧基吡啶-5-磺醯胺(SU11606)；6-[二氟[6-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]噻嗪-3-基]甲基]-喹啉(JNJ38877605，CAS 943540-75-8)；2-[4-[1-(喹啉-6-基甲基)-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-6-基]-1H-吡啶-1-基]乙醇(PF04217903，CAS 956905-27-4)；N-((2R)-1,4-二噁烷-2-基甲基)-N-甲基-N'-[3-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)-5-側氧基-5H-苯并[4,5]環庚并[1,2-b]吡啶-7-基]磺醯胺(MK2461，CAS 917879-39-1)；6-[[6-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]噻嗪-3-基]硫基]-喹啉(SGX523，CAS 1022150-57-7)；及(3Z)-5-[[[(2,6-二氯苯基)甲基]磺醯基]-3-[[3,5-二甲基-4-[(2R)-2-(1-吡咯啶基甲基)-1-吡咯啶基]羰基]-1H-吡咯-2-基]伸甲基]-1,3-二氫-2H-吡啶-2-酮(PHA665752，CAS 477575-56-7)。

IGF1R抑制劑包括(但不限於) BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MEDI-573及BI836845。欲回顧，參見例如Yee, JNCI, 104; 975 (2012)。

在另一個態樣中，本發明提供一種治療癌症的方法，係藉由將本發明之抗體藥物結合物與一或多種FGF下游信號傳導途徑抑制劑組合投與有需要之個體，該等抑制劑包括(但不限於) MEK抑制劑、Braf抑制劑、PI3K/Akt抑制劑、SHP2抑制劑以及mTor。

舉例而言，有絲分裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制劑包括(但不限

於) XL-518 (亦稱為 GDC-0973, Cas No. 1029872-29-4, 購自 ACC Corp.) ; 2-[(2-氯-4-碘苯基)胺基]-N-(環丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲醯胺(亦稱為 CI-1040 或 PD184352 且描述於 PCT 公開案第 WO2000035436 號中) ; N-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)胺基]-苯甲醯胺(亦稱為 PD0325901 且描述於 PCT 公開案第 WO2002006213 號中) ; 2,3-雙[胺基[(2-胺基苯基)硫基]伸甲基]-丁二腈(亦稱為 U0126 及描述於美國專利第 2,779,780 號) ; N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)胺基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2R)-2,3-二羥基丙基]-環丙烷磺醯胺(亦稱為 RDEA119 或 BAY869766 且描述於 PCT 公開案第 WO2007014011 號) ; (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙胺基)-8,9,16-三羥基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氫-1H-2-苯并氧雜環十四碳烷-1,7(8H)-二酮](亦稱為 E6201 且描述於 PCT 公開案第 WO2003076424 號) ; 2'-胺基-3'-甲氧基黃酮(亦稱為 PD98059, 購自 Biaffin GmbH & Co., KG, Germany) ; 威羅菲尼 (Vemurafenib) (PLX-4032, CAS 918504-65-1) ; (R)-3-(2,3-二羥基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基胺基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮 (TAK-733, CAS 1035555-63-5) ; 匹麻舍替 (Pimasertib) (AS-703026, CAS 1204531-26-9) ; 及曲美替尼二甲亞砜 (Trametinib dimethyl sulfoxide) (GSK-1120212, CAS 1204531-25-80) 。

磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 抑制劑包括(但不限於) 4-[2-(1H-吡啶-4-基)-6-[[4-(甲磺醯基)哌嗪-1-基]甲基]噁吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]嗎啉(亦稱為 GDC 0941 且描述於 PCT 公開案第 WO 09/036082 號及第 WO09/055730 號) ; 2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-側氧基-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氫咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(亦稱為 BEZ 235 或 NVP-BEZ 235, 且描述於 PCT 公開案第 WO 06/122806 號中) ; 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二嗎啉并嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(亦稱為 BKM120 或 NVP-BKM120, 且描述於 PCT 公開案第 WO2007/084786 號) ; 陶紫色替 (Tozasertib)

(VX680或MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亞甲基]-2,4-噻唑啉二酮(GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙醯基氧基)-1-[(二-2-丙烯基胺基)亞甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氫-11-羥基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-環戊并[5,6]萘并[1,2-c]哌喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866, CAS 502632-66-8); 及8-苯基-2-(嗎啉-4-基)-吡啶-4-酮(LY294002, CAS 154447-36-6)。

mTor包括(但不限於)替西莫司(Temsirolimus) (Torisel®); 理達莫司(Ridaforolimus) (正式稱為德福莫司(deferolimus), (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羥基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五側氧基-11,36-二氧雜-4-氮雜三環[30.3.1.0^{4,9}]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基環己基二甲基亞膦酸酯, 亦稱為AP23573及MK8669, 且描述於PCT公開案第WO 03/064383號中); 依維莫司(Everolimus) (Afinitor® 或 RAD001); 雷帕黴素(Rapamycin) (AY22989, Sirolimus®); 塞馬莫德(Simapimod) (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-雙[(3S)-3-甲基嗎啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055); 2-胺基-8-[反-4-(2-羥基乙氧基)環己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502, CAS 1013101-36-4); 及N²-[1,4-二側氧基-4-[[4-(4-側氧基-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)嗎啉鎗-4-基]甲氧基]丁基]-L-精胺醯基甘胺醯基-L-α-天冬胺醯基L-絲胺酸-, 內鹽(SF1126, CAS 936487-67-1)。

在又一個態樣中, 本發明提供一種治療癌症的方法, 係藉由將本發明之抗體藥物結合物與一或多種促細胞凋亡劑組合投與有需要之個體, 促細胞凋亡劑包括(但不限於) IAP抑制劑、Bcl2抑制劑、Mcl1抑制劑、Trail劑、Chk抑制劑。

舉例而言，IAP抑制劑包括(但不限於) LCL161、GDC-0917、AEG-35156、AT406及TL32711。IAP抑制劑之其他實例包括(但不限於)以下文獻中所揭示之抑制劑：WO04/005284、WO 04/007529、WO05/097791、WO 05/069894、WO 05/069888、WO 05/094818、US2006/0014700、US2006/0025347、WO 06/069063、WO 06/010118、WO 06/017295及WO08/134679，所有該等文獻皆以引用的方式併入本文中。

BCL-2抑制劑包括(但不限於)4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-環己烯-1-基]甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[[(1R)-3-(4-嗎啉基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]胺基]-3-[(三氟甲基)磺醯基]苯基]磺醯基]苯甲醯胺(亦稱為ABT-263且描述於PCT公開案第WO 09/155386號)；四癌菌素A(Tetrocarcin A)；抗黴素(Antimycin)；棉子酚((-)BL-193)；奧巴克拉(Obatoclax)；2-胺基-6-環戊基-4-(1-氰基-2-乙氧基-2-側氧基乙基)-4H-色酮-3-甲酸乙酯(HA14-1)；奧利默森(Oblimersen) (G3139，Genasense®)；Bak BH3肽；(-)-棉子酚乙酸(AT-101)；4-[4-[(4'-氯[1,1'-聯苯]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[[(1R)-3-(二甲基胺基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]胺基]-3-硝基苯基]磺醯基]-苯甲醯胺(ABT-737，CAS 852808-04-9)；及那托克斯(Navitoclax) (ABT-263，CAS 923564-51-6)。

促細胞凋亡受體促效劑(PARA)包括DR4 (TRAILR1)及DR5 (TRAILR2)，包括(但不限於)杜拉樂明(Dulanermin) (AMG-951，RhApo2L/TRAIL)；馬帕木單抗(Mapatumumab) (HRS-ETR1，CAS 658052-09-6)；來沙木單抗(Lexatumumab)(HGS-ETR2，CAS 845816-02-6)；艾博單抗(Apomab) (Apomab®)；可那木單抗(Conatumumab) (AMG655，CAS 896731-82-1)；及替加珠單抗(Tigatuzumab) (CS1008，CAS 946415-34-5，購自Daiichi Sankyo)。

檢查點激酶(CHK)抑制劑包括(但不限於) 7-羥基星形孢菌素(7-Hydroxystaurosporine) (UCN-01)； 6-溴-3-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)-5-(3R)-3-哌啶基-吡啶并[1,5-*a*]嘧啶-7-胺(SCH900776, CAS 891494-63-6)； 5-(3-氟苯基)-3-脲基噻吩-2-甲酸 N-[(S)-哌啶-3-基]醯胺(AZD7762, CAS 860352-01-8)； 4-(((3S)-1-氮雜二環[2.2.2]辛-3-基)胺基)-3-(1H-苯并咪唑-2-基)-6-氯喹啉-2(1H)-酮(CHIR 124, CAS 405168-58-3)； 7-胺基放線菌素 D (7-AAD)、異格蘭瑪德(Isogranulatimide)、得澳門辛(debromohymenialdisine)、N-[5-溴-4-甲基-2-[(2S)-2-嗎啉基甲氧基]-苯基]-N'-(5-甲基-2-吡嗪基)脲(LY2603618, CAS 911222-45-2)； 蘿蔔硫素(Sulforaphane) (CAS 4478-93-7, 4-甲基亞磺醯基丁基異硫氰酸酯)； 9,10,11,12-四氫-9,12-環氧-1H-二吡啶并[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]吡咯并[3,4-*i*][1,6]苯并二氮嘧-1,3(2H)-二酮(SB-218078, CAS 135897-06-2)； 及 TAT-S216A(YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL)， 及 CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqrr)。

在一個態樣中，本發明提供一種治療癌症的方法，係藉由向有需要之個體投與本發明之抗體藥物結合物與一或多種FGFR抑制劑之組合。舉例而言，FGFR抑制劑包括(但不限於)丙胺酸布立尼布(Brivanib alaninate) (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基氧基)-5-甲基吡啶并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-6-基氧基)丙-2-基)2-胺基丙酸酯)； 瓦加特氟(Vargatef) (BIBF1120, CAS 928326-83-4)； 多韋替尼雙乳酸(Dovitinib dilactic acid) (TKI258, CAS 852433-84-2)； 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(BGJ398, CAS 872511-34-7)； 達魯舍替(Danuserib) (PHA-739358)； 及N-[2-[[4-(二乙胺基)丁基]胺基]-6-(3,5-二甲氧基苯基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-基]-N'-(1,1-二甲基乙基)脲

(PD173074, CAS 219580-11-7)。在一個特定實施例中，本發明提供一種治療癌症的方法，係藉由向有需要之個體投與本發明之抗體藥物結合物與另一種FGFR2抑制劑之組合，FGFR2抑制劑諸如3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基)-1-(6((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)胺基)嘧啶-4-基)-1-甲基脲(亦稱為BGJ-398)；或4-胺基-5-氟-3-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)喹啉-2(1H)-酮(亦稱為多韋替尼(dovitinib)或TKI-258)、AZD4547 (Gavine等人, 2012, Cancer Research 72, 2045-56, N-[5-[2-(3,5-二甲氧基苯基)乙基]-2H-吡唑-3-基]-4-(3R,5S)-二甲基哌嗪-1-基)苯甲醯胺)、普納替尼(Ponatinib) (AP24534; Gozgit等人, 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99; 3-[2-(咪唑并[1,2-b]噻嗪-3-基)乙炔基]-4-甲基-N-{4-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-(三氟甲基)苯基}苯甲醯胺, CAS 943319-70-8)。

醫藥組合物

為製備包括免疫結合物的醫藥或無菌組合物，將本發明之免疫結合物與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑混合。組合物可另外含有一或多種其他治療劑，該等治療劑適於治療或預防癌症(乳癌、結腸直腸癌、肺癌、多發性骨髓瘤、卵巢癌、肝癌、胃癌、胰臟癌、急性骨髓白血病、慢性骨髓白血病、骨肉瘤、鱗狀細胞癌、周邊神經鞘腫瘤、許旺氏細胞瘤(schwannoma)、頭頸癌、膀胱癌、食道癌、巴雷氏食道癌(Barretts esophageal cancer)、神經膠母細胞瘤、軟組織之透明細胞肉瘤、惡性間皮瘤、多發性神經纖維瘤、腎癌、黑色素瘤、前列腺癌、良性前列腺肥大(BPH)、男性乳房肥大症、橫紋肌肉瘤及子宮內膜異位)。

治療劑及診斷劑之調配物可藉由與呈例如凍乾粉末、漿液、水溶液、洗液或懸浮液之形式的生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑混合而製備(參見例如Hardman等人, Goodman and Gilman's The

Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001 ; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000 ; Avis,等人 (編), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993 ; Lieberman,等人 (編), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990 ; Lieberman,等人 (編) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990 ; Weiner 及 Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000)。

在一個特定實施例中，本發明之抗體藥物結合物的臨床適用形式(CSF)為存於小瓶中之凍乾物，其含有ADC、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20。凍乾物可用注射用水復原，溶液包含ADC、丁二酸鈉、蔗糖及聚山梨醇酯20，pH為約5.0。對於隨後靜脈內投與而言，所得溶液通常在載劑溶液進一步稀釋。

選擇用於治療的投藥方案視若干因素而定，包括血清或組織中之實體周轉率、症狀級別、實體之免疫原性，及對生物基質中靶細胞之可接近性。在某些實施例中，根據可接受的副作用程度，投藥方案使遞送至患者之治療量最大化。因此，生物遞送量部分地視特定實體及所治療病狀之嚴重程度而定。可利用選擇抗體、細胞激素及小分子之適當劑量的規則(參見例如 Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996 ; Kresina (編), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991 ; Bach (編), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993 ; Baert等人, New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003 ; Milgrom等人, New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999 ; Slamon等人, New Engl. J. Med. 344:783-

792, 2001 ; Beniaminovitz 等人, New Engl. J. Med. 342:613-619, 2000 ; Ghosh等人, New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003 ; Lipsky等人, New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000)。

適當劑量係由臨床醫師確定，例如使用此項技術中已知或懷疑可影響治療或預測可影響治療之參數或因素來確定。一般而言，劑量由稍微小於最佳劑量之量開始且隨後以小的增量增加，直至相對於任何消極副作用達成所要或最佳效果為止。重要的診斷度量包括症狀度量，例如發炎或所產生發炎性細胞激素之含量。

本發明之醫藥組合物中活性成分之實際劑量水準可變化，以獲得有效達成針對特定患者、組合物及投藥模式之所要治療反應，而對患者不具有毒性的活性成分之量。選定劑量水準視多種藥物動力學因素而定，包括所用本發明特定組合物或其酯、鹽或醯胺的活性；投藥途徑；投藥時間；所用特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所用特定組合物組合使用的其他藥物、化合物及/或物質；所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史；及醫學技術中已知的類似因素。

包含本發明抗體或其片段的組合物可藉由連續輸注或藉由每隔一定時間給藥來提供，例如一天、一週或每週1-7次、每隔一週一次、每三週一次、每四週一次、每五週一次、每六週一次、每七週一次或每八週一次。劑量可靜脈內、皮下、局部、經口、鼻、直腸、肌肉內、大腦內或藉由吸入來提供。特定劑量方案為包括避免顯著不良副作用之最大劑量或劑量頻率的方案。

對於本發明之免疫結合物而言，投與患者的劑量可為每公斤患者體重0.0001 mg至100 mg。以每公斤患者體重計，劑量可為0.0001 mg至20 mg，0.0001 mg至10 mg，0.0001 mg至5 mg，0.0001 mg至2 mg，0.0001 mg至1 mg，0.0001 mg至0.75 mg，0.0001 mg至0.5 mg，

0.0001 mg至0.25 mg，0.0001 mg至0.15 mg，0.0001 mg至0.10 mg，0.001 mg至0.5 mg，0.01 mg至0.25 mg或0.01 mg至0.10 mg。本發明之抗體或其片段之劑量可使用患者體重(公斤，kg)乘以所投與劑量(mg/kg)來計算。

本發明之免疫結合物可重複給予且投藥間隔期可為至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2個月、75天、3個月或至少6個月。在一個特定實施例中，本發明之免疫結合物之給予每3週重複進行。

用於特定患者之有效量可根據以下因素而變：諸如所治療病狀、患者之整體健康狀況、投藥方法、途徑及劑量，及副作用之嚴重程度(參見例如Maynard等人，A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996；Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001)。

投藥途徑可為例如局部或皮膚施用；靜脈內、腹膜內、腦內、肌肉內、眼內、動脈內、腦脊髓內、病灶內注射或輸注；或藉由持續釋放系統或植入物(參見例如Sidman等人，Biopolymers 22:547-556, 1983；Langer等人，J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981；Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982；Epstein等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985；Hwang等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980；美國專利第6,350,466號及第6,316,024號)。必要時，組合物亦可包括增溶劑或局部麻醉劑，諸如使注射部位之疼痛緩解的利多卡因(lidocaine)，或兩者。另外，亦可使用經肺投藥，例如利用吸入器或噴霧器，及具有霧化劑之調配物。參見例如美國專利第6,019,968號、第5,985,320號、第5,985,309號、第5,934,272號、第5,874,064號、第5,855,913號、第5,290,540號及第4,880,078號；及PCT公開案第

WO 92/19244 號、第 WO 97/32572 號、第 WO 97/44013 號、第 WO 98/31346 號、第 WO 99/66903 號，各案以全文引用的方式併入本文中。

本發明之組合物可經由一或多種投藥途徑、使用此項技術中已知之多種方法中之一或多者投與。如熟習此項技術者所瞭解，投藥途徑及/或投藥模式將視所需結果而變化。選用於本發明免疫結合物之投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、脊髓或其他非經腸投藥途徑，例如注射或輸注。非經腸投藥可代表除經腸及局部投藥外的投藥模式，通常藉由注射投藥，且包括(不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊髓內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。或者，本發明組合物可經由非腸胃外途徑投與，諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑，例如鼻內、經口、陰道、直腸、舌下或局部。在一個實施例中，本發明之免疫結合物藉由輸注投與。在另一個實施例中，本發明之免疫結合物皮下投與。

若本發明之免疫結合物以控制釋放或持續釋放系統投與，則可利用泵達成控制釋放或持續釋放(參見Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20, 1987; Buchwald等人, *Surgery* 88:507, 1980; Saudek等人, *N. Engl. J. Med.* 321:574, 1989)。可利用聚合物材料達成本發明療法之控制或持續釋放(參見例如 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer及Wise (編), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen及Ball (編), Wiley, New York, 1984; Ranger及Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1983; 亦參見Levy等人, *Science* 228:190, 1985; During等人, *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howard等人, *J. Neurosurg.* 71:105, 1989; 美國專利第

5,679,377號；美國專利第5,916,597號；美國專利第5,912,015號；美國專利第5,989,463號；美國專利第5,128,326號；PCT公開案第WO 99/15154號；及PCT公開案第WO 99/20253號。持續釋放調配物中所用之聚合物實例包括(但不限於)聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙基吡咯啉酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚乳酸交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)及聚原酸酯。在一個實施例中，持續釋放調配物中使用之聚合物呈惰性、不含可浸出雜質、儲存穩定、無菌且生物可降解。控制或持續釋放系統可靠近預防或治療目標置放，因此僅需要一小部分全身性劑量(Goodson, 於Medical Applications of Controlled Release, 前述, 第2卷, 第115頁-第138頁中, 1984)。

控制釋放系統論述於Langer (Science 249:1527-1533, 1990)之評述中。熟悉此項技術者已知的任何技術可用於製備包含本發明之一或多種免疫結合物的持續釋放調配物。參見例如美國專利第4,526,938號、PCT公開案WO 91/05548、PCT公開案WO 96/20698；Ning等人, Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996；Song等人, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995；Cleek等人, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997；及Lam等人, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997，各文獻均以全文引用的方式併入本文中。

若本發明之免疫結合物局部投與，則其可調配成以下形式：軟膏、乳膏、經皮貼片、洗液、凝膠、噴霧劑、氣溶膠、溶液、乳液，或熟習此項技術者熟知的其他形式。參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 第19版, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。對於不可噴霧的

局部劑型而言，典型地使用黏稠至半固體或固體形式，其包含載劑或一或多種與局部施用相容的賦形劑且在一些情況下具有大於水的動態黏度。適合調配物包括(不限於)溶液、懸浮液、乳液、乳膏、軟膏、散劑、擦劑、油膏及其類似物，必要時將其滅菌或與影響諸如滲透壓之各種性質之助劑(例如防腐劑、穩定劑、濕潤劑、緩衝劑或鹽)混合。其他適合局部劑型包括可噴霧氣溶膠製劑，其中活性成分(在一些情況下與固體或液體惰性載劑組合)以與加壓揮發物(例如氣態推進劑，諸如氟利昂(freon))之混合物形式封裝於壓擠瓶中。必要時，亦可向醫藥組合物及劑型中添加增濕劑或保濕劑。該等其他成分之實例在此項技術中已為熟知。

若包含免疫結合物之組合物鼻內投與，則其可調配成氣溶膠形式、噴霧劑、霧或滴劑形式。特別地，根據本發明使用之預防劑或治療劑可方便地以使用適合推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他適合氣體)之加壓包或噴霧器呈現之氣溶膠噴霧形式遞送。在加壓氣溶膠之情況下，劑量單位可藉由提供一個遞送計量之閥決定。用於吸入器或吹入器中的膠囊及藥筒(由例如明膠構成)可調配成含有化合物與適合粉末基質(諸如乳糖或澱粉)之粉末混合物。

與第二治療劑(例如細胞激素、類固醇、化學治療劑、抗生素或輻射)共投與或治療的方法在此項技術中已知(參見例如Hardman等人, (編) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版增刊, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole及 Peterson (編) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner及 Longo (編) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.)。有效量之治療劑可使症狀

減少至少10%、至少20%、至少約30%、至少40%或至少50%。

可與本發明免疫結合物組合投與的其他療法(例如預防劑或治療劑)與本發明免疫結合物投與間隔小於5分鐘、小於30分鐘、1小時、約1小時、約1小時至約2小時、約2小時至約3小時、約3小時至約4小時、約4小時至約5小時、約5小時至約6小時、約6小時至約7小時、約7小時至約8小時、約8小時至約9小時、約9小時至約10小時、約10小時至約11小時、約11小時至約12小時、約12小時至18小時、18小時至24小時、24小時至36小時、36小時至48小時、48小時至52小時、52小時至60小時、60小時至72小時、72小時至84小時、84小時至96小時、或96小時至120小時。兩種或兩種以上療法可在同一次患者就診時投與。

在某些實施例中，本發明之免疫結合物可經調配以確保適當的活體內分佈。舉例而言，血腦障壁(BBB)排斥許多高度親水性化合物。為確保本發明之治療化合物穿過BBB(需要時)，該等化合物可調配於例如脂質體中。關於製造脂質體之方法，參見例如美國專利第4,522,811號、第5,374,548號及第5,399,331號。脂質體可包含選擇性輸送至特定細胞或器官內、從而增強靶向藥物遞送的一或多種部分(參見例如Ranade, (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685)。例示性靶向部分包括葉酸鹽或生物素(參見例如Low等人之美國專利第5,416,016號)；甘露糖苷(Umezawa等人, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038)；抗體(Bloeman等人, (1995) *FEBS Lett.* 357:140；Owais等人, (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180)；界面活性劑蛋白A受體(Briscoe等人, (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134)；第120頁(Schreier等人, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090)；亦參見K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273。

本發明提供向有需要之個體投與包含單獨本發明免疫結合物或與其他療法之組合之醫藥組合物的方案。本發明之組合療法中之療法(例如預防劑或治療劑)可伴隨或依序投與個體。本發明之組合療法中之療法(例如預防劑或治療劑)亦可循環投與。循環療法包括投與第一療法(例如第一預防或治療劑)一段時間，隨後投與第二療法(例如第二預防或治療劑)一段時間且重複此依序投藥，亦即循環，以便降低對療法(例如藥劑)之一之抗藥性發展，從而避免或降低療法(例如藥劑)之一的副作用，及/或提高療效。

本發明之組合療法中的療法(例如預防或治療劑)可並行投與個體。

術語「並行」不限於剛好同時投與療法(例如預防或治療劑)，而是意謂包含本發明抗體或其片段的醫藥組合物依序及在時間間隔內投與個體，使得本發明抗體可與其他療法一起起作用，從而得到比其以其他方式投與更多的益處。舉例而言，各療法可同時或以任何次序在不同時間點依序投與個體；然而，若不同時投與，則其應在足夠接近的時間投與，以提供所要治療或預防作用。各療法可以任何適當形式及藉由任何適合途徑分別投與個體。在不同實施例中，療法(例如預防或治療劑)投與個體的間隔時間小於15分鐘、小於30分鐘、小於1小時、約1小時、約1小時至約2、約2小時至約3小時、約3小時至約4小時、約4小時至約5小時、約5小時至約6小時、約6小時至約7小時、約7小時至約8小時、約8小時至約9小時、約9小時至約10小時、約10小時至約11小時、約11小時至約12小時、24小時、48小時、72小時或1週。在其他實施例中，兩種或兩種以上療法(例如預防或治療劑)在同一次患者就診時投與。

組合療法之預防或治療劑可於同一醫藥組合物中投與個體。或者，組合療法之預防或治療劑可於各別醫藥組合物中並行投與個體。

預防或治療劑可藉由相同或不同投藥途徑投與個體。

實例

以下實例及中間物用來說明本發明，而非限制其範疇。

實例1：篩選抗FGFR2/4抗體

細胞株

Ba/F3細胞購自DSMZ, KatoIII、SNU16、SNU5及HCI-H716細胞購自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)且NUGC3細胞獲自日本生物資源保存研究中心(Japanese Collection of Research Bioresources, JCRB)細胞庫。所有細胞株在補充有胎牛血清(FBS)的適當生長培養基中常規培養，如其各別供應商所建議。

產生重組人類、食蟹猴、小鼠及大鼠FGFR載體

人類、小鼠及大鼠FGFR胞外域為根據基因庫(GenBank)或Uniprot資料庫之胺基酸序列所合成的基因(參見表2)。食蟹猴FGFR2及4個ECD cDNA模板為根據胺基酸序列資訊所合成的基因，此資訊係使用來自不同食蟹猴組織之mRNA所產生(例如Zyagen Laboratories；表3)。所有合成的DNA片段選殖入適當表現載體中，例如基於CMV之載體或具有C末端標籤以便進行純化的pCDNA™3.1。

表2.產生表現FGFR之載體。胺基酸編號係根據表中所提供之寄存編號或seq IDs

名稱	描述	寄存編號	SEQ ID NO
人類FGFR1 IIIb D1-3	人類FGFR1同功異型物IIIb，殘基22-373-TAG	NM 015850	121
人類FGFR2 IIIb D1-3	人類FGFR2同功異型物IIIb，殘基22-378-TAG	NM_022970/ P21802-3	122
人類FGFR3 IIIb D1-3	人類FGFR3同功異型物IIIb，殘基23-377-TAG	NM_000142	123
人類FGFR4 ECD	人類FGFR4胞外域，殘基22-369-TAG	NM_002011; P22455	124
人類FGFR2 IIIc D1-3	人類FGFR2同功異型物IIIc，殘基22-378-TAG	NM_022970/ P21802-1	125

食蟹猴 FGFR2 IIIb D1-3	食蟹猴FGFR2同功異型物 IIIb，殘基22-378-TAG	不適用。	126
小鼠FGFR2 IIIb D1-3	小鼠 FGFR2 同功異型物 IIIb，殘基22-378-TAG	NM_010207	127
大鼠FGFR2 IIIb D1-3	大鼠 FGFR2 同功異型物 IIIb，殘基41-397-TAG	XM_001079450	128
大鼠FGFR4	大鼠FGFR4，殘基17-367-TAG	NM_001109904	129
食蟹猴FGFR4	食蟹猴 FGFR4，殘基 17-366-TAG	不適用。	130
小鼠FGFR4	小鼠FGFR4，殘基17-366-TAG	小鼠NM_008011	131

表3：食蟹猴FGFR2及FGFR4蛋白之序列

構築體	單字母碼形式之胺基酸序列	SEQ ID NO
食蟹猴 FGFR2 IIIb D1-3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGRPSFSLVEDTTLEPEEPPTKY QISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGPN NRTVLIGEYLQIKGATPRDSGLYACTATRTVDSETWYFMV NVTDAISSGDDDDTDGAEDFVSENGNNKRAPYWTNTEK MEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPTPTMRWLKNGKEFKQ EHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSI NHTYHLDVVERSHPRPILQAGLPANASTVVG GDVEFVCKV YSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLKHSGINSS NAEVLALFNVTEADAGEYICKVSNYIGQANQSAWLTVLPK QQAPGREKEITASPDYLEKLEFRHDSGLNDIFEAQKIEWHE	126
食蟹猴FGFR4	METDTLLLWVLLLWVPGSTGLEASEEVELEPC LAPSMEQQ EQELTVALGQPVRLCCGRAERG GHWYKEGSRLAPAGRVR GWRGRLEIASFLPEDAGRYLCLARASMIVLQNVTLTIDDSL TSSNDDDPQSHRDSSNGHIYPQQAPYWTHPQRMEKKLH AVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLKDGQAFHGENRIGGIR LRHQHWSLVMESVVP SDRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDV LERSPHRPILQAGLPANTTAVVGSDVELLCKVYSDAQPHIQ WLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKTADINSSEVEVLYLRN VSAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDLTWTAAT PEARYTDKLEFRHDSGLNDIFEAQKIEWHE	130

表現重組FGFR蛋白

所要FGFR重組蛋白表現於HEK293源細胞株(293T)中，該等細胞株預先適應於懸浮培養液且在無血清培養基、無L-麩胺醯胺之50% HyClone™ SFM4Transfx-293 (HyClone™) 及 50% FreeStyle-293 (Gibco®)之混合液中生長。小規模與大規模蛋白質生產均經由瞬時轉染進行且在多個振盪器燒瓶(Nalgene®)中進行，各多達1 L且以聚伸乙亞胺(PEI, 25K, AlfaAesar®)作為質體載劑。當生物素化蛋白質欲經

由C末端Avi標籤表現時，攜帶BirA酶之基因的質體以相對於ECD蛋白質體1:2之比率包含。總DNA與聚伸乙亞胺係以1:3 (w:w)之比率使用。DNA與培養液比率為1 mg/L。轉染後第6天收穫細胞培養上清液，離心且無菌過濾，隨後純化。

標記化蛋白質純化

重組標記化FGFR2及FGFR4 ECD蛋白(例如APP-FGFR2及APP-FGFR4 ECD)係藉由收集細胞培養上清液來純化。抗APP管柱係藉由使抗APP單株抗體與CNBr活化Sepharose®4B以每毫升樹脂10 mg抗體之最終比率偶合來製備。表現上清液係以每分鐘1-2 mL之流速或藉由重力流動施加至抗APP管柱中。用PBS基線洗滌之後，結合物質用100 mM甘胺酸(pH 2.7)溶離且立即相對於PBS透析隔夜且接著無菌過濾。藉由量測280 nm吸光度且利用根據個別蛋白質胺基酸序列所計算之蛋白質消光係數換算來測定蛋白質濃度。接著藉由SDS-PAGE、分析型尺寸排阻層析法(HPLC-SEC)表徵所純化蛋白質。對於親和力純化製劑中具有超過>10%聚集物的彼等物而言，進行第二步驟SEC純化，隨後進行確認性表徵。

產生Ba/F3 FGFR2細胞株

為產生此等細胞，將人類FRGR2-IIIb-C3 (NM_022970)選殖入pENTR™ TOPOD®載體(Invitrogen目錄#K2400-20)中且接著在CMV啟動子下選殖入pLenti6 DEST™載體(Invitrogen目錄#V49610)中。接著封裝病毒且Ba/F3細胞(DSMZ目錄#ACC300)經慢病毒旋轉感染，隨後在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下用20 µg殺稻瘟菌素(例如Invitrogen，目錄#A11139-03或Cellgro®，目錄#30-100-RB)處理且用IL3 (R & D systems，目錄#403-ml-010)選擇5天。存活細胞接著在補充有10% FBS (Clontech，目錄#631101)、2 µg/mL肝素(Sigma，目錄#H3149)及20 µg/mL殺稻瘟菌素(例如Invitrogen，目錄#A11139-03或

Cellgro®，目錄 #30-100-RB)、但不含 IL3 的培養基 (RPMI (Invitrogen，目錄 #11875-093) 中生長 1 個月。存活細胞接著稀釋性選殖以產生純系細胞群體，其接著用於隨後研究。

***HuCAL PLATINUM®* 淘選**

選擇識別人類 FGFR2 之抗體時，使用多種淘選策略。針對人類 FGFR 蛋白的治療性抗體係藉由使用市購噬菌體呈現文庫 Morphosys HuCAL PLATINUM® 文庫作為抗體變異體蛋白質之來源選擇結合至 FGFR2 的純系來產生。噬菌體質體文庫係根據 HuCAL® 概念 (Knappik 等人，2000, J Mol Biol 296: 57-86) 且採用噬菌體表面呈現 Fab 的 CysDisplay™ 技術 (WO01/05950)。

分離抗 FGFR2 抗體時，使用多種不同淘選策略 (使用固相、溶液、全細胞及有差異的全細胞方法)。

對於重組 FGFR2 之固相淘選

抗原選擇過程之前，進行塗佈檢查式 ELISA 以確定抗原之最佳塗佈濃度。在經由被動式吸附或經由靶向抗原之各別標籤之捕捉抗體塗佈於 Maxisorp™ 盤 (Nunc®) 上的固相淘選方法中，使用具有不同標籤的不同重組 FGFR2 蛋白。或者，使用 Reacti-Bind™ NeutrAvidin™ 塗佈之聚苯乙烯剝離盤 (Pierce) 捕捉生物素化 FGFR2 抗原。96 孔 Maxisorp™ 盤 (Nunc®) 中適當數目個 (與亞文庫數目有關) 的孔在 4°C 用抗原塗佈隔夜。所塗孔用 PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)/5% 乳粉阻斷。每次淘選時，均圍繞 HuCAL PLATINUM® 噬菌體-抗體阻斷。阻斷程序之後，向塗有抗原且經阻斷的各孔中添加預阻斷噬菌體混合物且在微量滴定盤 (MTP) 振盪器上、在室溫 (RT) 下培育 2 小時。隨後，藉由若干洗滌步驟洗掉無特異性的結合噬菌體。溶離特異性結合的噬菌體時，在室溫下歷時 10 分鐘 (min) 添加 25 mM DTT (二硫蘇糖醇)。DTT 溶離液用於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 感染 TG-1 細胞。感染之後，將細菌塗鋪於 LB

(溶原性培養液)/Cam (氯黴素)瓊脂盤上且在30℃培育隔夜。自培養盤擦去菌群且用於噬菌體援救、所選純系之多株擴增，及噬菌體產生。各FGFR2固相淘選策略包含輪數個別化之淘選且含有獨特的抗原、抗原濃度、緩衝液組成及洗滌嚴格度。

使用抗生蛋白鏈菌素偶合磁性珠粒、對於重組FGFR2之溶液淘選

溶液淘選方法之必要條件為抗原之生物素化及確認生物素化抗原之活性保持。在溶液淘選期間，Fab呈現噬菌體及生物素化抗原在有利於噬菌體可接近抗原的溶液中培育。

對於各噬菌體庫，以1x Chemiblocker™阻斷抗生蛋白鏈菌素珠粒(Dynabeads® M-280抗生蛋白鏈菌素；Invitrogen)。同時，每次淘選時，用等體積之2x Chemiblocker™/0.1% Tween20圍繞HuCAL PLATINUM®噬菌體-抗體阻斷。接著，將某一濃度的生物素化抗原(例如100 nM)添加至預吸附且阻斷的噬菌體粒子中且在旋轉器上、在室溫下培育1-2小時。噬菌體-抗原複合物係使用所阻斷之抗生蛋白鏈菌素珠粒捕捉且結合至抗生蛋白鏈菌素珠粒的噬菌體粒子係用磁性分離器收集。無特異性的結合噬菌體藉由若干個洗滌步驟洗掉。自抗生蛋白鏈菌素珠粒溶離特異性結合的噬菌體時，在室溫下歷時10分鐘添加25 mM DTT。DTT溶離液如針對固相淘選所述加以處理。

各FGFR2液相淘選策略包含輪數個別化之淘選且含有獨特的抗原、抗原濃度及洗滌嚴格度。

對於過度表現FGFR2之細胞的全細胞淘選

每輪細胞淘選時，HuCAL PLATINUM®噬菌體-抗體在PBS/FCS中預阻斷。同時，使每個噬菌體庫 $0.5-1.0 \times 10^7$ 個靶細胞(經FGFR2穩定轉染的Ba/F3、Kato-III、SNU16、H716) (顯示FGFR2過度表現)再懸浮於冰上之PBS/FCS中。

將所阻斷之靶細胞離心，再懸浮於預阻斷的噬菌體粒子中且在

旋轉器上、在4℃培育2小時。噬菌體-細胞複合物於PBS/FCS中洗滌。使用甘胺酸緩衝液(pH 2.2)、藉由酸性溶離自靶細胞溶離特異性結合的噬菌體。離心之後，藉由添加無緩衝的Tris中和上清液(溶離液)。含有噬菌體的最終上清液用於大腸桿菌感染TG1培養物。以下步驟係如固相淘選章節中所述進行。

更詳細而言，進行全細胞淘選，其中使用細胞進行每一輪淘選，或者進行有差異的全細胞淘選，此意謂使用細胞或重組蛋白進行連續多輪淘選。針對重組抗原的多輪選擇係如針對固相或溶液淘選所述進行。

成熟淘選

為了獲得親和力增強的FGFR2特異性抗體，進行成熟淘選(Prassler等人, 2009, Immunotherapy, 1: 571-583)。為此目的，使用不同FGFR2抗原進行標準淘選(固相及液相淘選)，如上所述。

淘選之後，使用不同特異性限制酶將噬菌體源pMORPH30[®]載體DNA之Fab編碼片段消化以產生LCDR3或HCDR2成熟文庫。使用TRIM[™]技術(Virnekas等人, 1994, Nucleic Acids Research 22: 5600-5607)置換插入序列。

對所產生文庫進行擴增且進行兩輪以上淘選，其中洗滌嚴格度增強且抗原濃度降低。

次選殖及微表現所選Fab片段

為了有利於可溶性Fab之快速表現，將所選HuCAL PLATINUM[®]噬菌體之Fab編碼插入序列自pMORPH[®]30呈現載體次選殖入pMORPH[®]x11表現載體pMORPH[®]x11_FH中。

大腸桿菌TG1-F轉型之後，如先前所述(Rauchenberger等人, 2003 J Biol Chem 278: 38194-38205)，含有HuCAL[®]-Fab片段之周邊細胞質萃取物進行單一純系表現及製備。

ELISA篩選

使用ELISA篩選，自淘選輸出結果中鑑別結合至目標抗原的單一Fab純系。使用含有Fab的粗大腸桿菌溶菌物測試Fab。

Maxisorp™ (Nunc®) 384孔盤用以先前確定之飽和濃度存於PBS中的所關注FGFR抗原(經由被動式吸附或經由靶向抗原之各別標籤的捕捉抗體)塗佈。或者，使用Reacti-Bind™ NeutrAvidin™塗佈之聚苯乙烯剝離盤(Pierce)捕捉生物素化FGFR2抗原。

用含5%脫脂乳粉之PBS阻斷培養盤之後，添加含有Fab的大腸桿菌溶菌物。使用Attophos®螢光受質(Roche，目錄#11681982001)、藉由F(ab)₂特異性山羊抗人類IgG與鹼性磷酸酶結合物(1:5000稀釋)偵測Fab之結合。記錄535 nm螢光發射及430 nm激發。

FACS篩選(螢光活化細胞分類)

FACS篩選中，自淘選輸出結果中鑑別出結合至細胞表面所表現抗原的單一Fab純系。使用含有Fab的粗大腸桿菌溶菌物測試Fab的細胞結合。

在此等研究中，將100 µl細胞懸浮液轉移至新96孔盤中(產生 1×10^5 個細胞/孔)。將含有靶細胞懸浮液的盤離心且丟棄上清液。使剩餘細胞離心塊再懸浮且向對應孔中添加50 µl含有Fab的細菌萃取物。

或者，使細胞離心塊再懸浮於50 µl FACS緩衝液(PBS，3% FCS)中且向對應孔中添加等體積的含Fab細菌萃取物。

細胞-抗體懸浮液接著在冰上培育1小時。培育之後，將細胞離心且用200 µl FACS緩衝液洗滌三次。每次洗滌步驟之後，將細胞離心且小心地再懸浮。

添加二次偵測抗體(PE與山羊抗人類IgG結合物；Dianova)且樣品在冰上培育且隨後根據Fab培育情況加以洗滌。用FACSArray™儀器測定螢光強度。

表現及純化HuCAL[®] Fab片段

在大腸桿菌TG1 F-細胞中表現Fab片段。培養物在30℃振盪18小時。收穫細胞且使用溶菌酶與Bug Buster[®]蛋白質萃取試劑(Novagen, Germany)之組合進行碎裂。經由IMAC (Qiagen[®], Germany)分離經His6標記之Fab片段且藉由UV光譜測定法測定蛋白質濃度。以變性、還原型15% SDS-PAGE (十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳)分析代表性所選樣品之純度。

Fab製劑之均質性係在天然狀態下藉由具有校準標準的尺寸排阻層析法(HP-SEC)測定。

換算為IgG及IgG表現

為了表現全長IgG，重鏈(VH)及輕鏈(VL)之可變域片段經由Fab表現載體次選殖入適用於人類IgG1之pMorph[®]_hIg載體中。或者，用pMORPH[®]4表現載體DNA轉染真核HKB11細胞。轉染後3或7天收穫細胞培養上清液。無菌過濾之後，利用液體操作站對溶液進行蛋白質A親和性層析(MabSelect SURE[™], GE Healthcare)。除非另有說明，否則相對於1x杜貝科氏PBS (Dulbecco's PBS) (pH 7.2, Invitrogen)進行緩衝液交換且對樣品進行無菌過濾(0.2 µm孔徑)。藉由UV光譜測定法測定蛋白質濃度且在變性、還原條件下使用測徑規Labchip[®]系統或以SDS-PAGE分析IgG純度。

生物分析

在下文例示的分析中評估依循上述淘選方法獲得的抗FGFR抗體：

BaF3/CMV-FGFRIIB-C3細胞增殖分析

為測定抗FGFR2抗體抑制FGF1依賴性細胞增殖的能力，使用工程化Ba/F3細胞株(BaF3/CMV-FGFRIIB-C3)進行增殖分析，該細胞株經全長FGFR2IIb受體ECD與含有各別激酶域之FGFR1胞內域之嵌合

體穩定轉導。添加人類FGF1有利於此細胞株之細胞增殖。

將細胞再懸浮於完全生長培養基(RPMI + 10% FCS + 30 ng/ml FGF1 + 2 µg/ml肝素+ 20 µg/ml殺稻瘟菌素)中且以 8×10^3 個細胞/孔(80 µl)之細胞密度接種於白色96孔平底分析盤(Corning® Costar, #3903)且在37°C及5% CO₂培育隔夜。

次日，HuCAL®抗體(Fab或IgG)在完全生長培養基中稀釋至所要濃度(5倍濃縮)。向前一日接種之細胞中添加20 µl抗體溶液且培養細胞72小時。72小時之後，向各孔中添加100 µl Cell Titer-Glo™發光細胞生存力分析試劑(#G7571; Promega)且在室溫下輕微振盪培育15分鐘，隨後以照度計(GeniosPro, Tecan)讀取發光。測定半最大抑制濃度(IC₅₀值)時，進行Fab/IgG滴定且使用GraphPad Prism計算IC₅₀。

評估HuCAL® IgG之潛在促效活性(如依據抗體在外源FGF1不存在下促進工程化BaF/3細胞增殖的能力所確定)時，將細胞及IgG在稀釋培養基(不含FGF1的完全生長培養基)中稀釋。接種細胞及添加IgG係在同一天進行。

親和力測定

測定K_D時，使用抗體蛋白質之單體分率(至少90%單體含量，如藉由分析型SEC所分析；分別為Fab使用Superdex™75 (Amersham Pharmacia)，或IgG使用Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience)。

(a)使用Sector®成像儀6000 (中型discovery®)測定K_D的溶液平衡滴定(SET)方法

溶液中之親和力測定基本上如文獻(Friguet等人, 1985 J Immunol Methods 77: 305-319)中所述進行。為了提高SET方法之靈敏性及精確性，將經典ELISA轉換為基於ECL之技術(Haenel等人, 2005 Anal Biochem 339: 182-184)。使用以下試劑如所述測定HuCAL®_IgG之K_D：在4°C，生物素化hFGFR2於PBS中以0.5 µg/mL塗佈於標準MSD

盤上隔夜。

洗滌MSD盤及每孔添加30 µl含有界面活性劑的MSD讀取緩衝液T之後，使用Sector®成像儀6000 (中型Discovery®, Gaithersburg, MD, USA)偵測電化學發光信號。

使用應用於定製擬合模型的XLfit™ (IDBS)軟體評估資料。測定Fab分子之 K_D 時，使用以下擬合模型(根據Haenel等人, 2005 Anal Biochem 339: 182-184)：

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

$[Fab]_t$ ：所施加之總Fab濃度

x ：所施加之總可溶性抗原濃度(結合位點)

B_{\max} ：缺少抗原之Fab的最大信號

K_D ：親和力。

測定IgG分子之 K_D 時，IgG使用以下擬合模型(根據Piehler等人(1997 J Immunol Methods 201: 189-206)修改)且資料概要呈現於圖1中：

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

$[IgG]$ ：所施加之總IgG濃度

x ：所施加之總可溶性抗原濃度(結合位點)

B_{\max} ：缺少抗原之IgG的最大信號

K_D ：親和力。

淘選策略及篩選之總結

總體而言，使用重組抗原材料以及如上文概述的細胞株，採用28種不同淘選策略。使用上述分析，根據特異性及交叉反應性篩選淘

選輸出結果且選擇935個純系用於測序。所述篩選過程之後，選擇15種抗體供進一步表徵，如下文實例中所述。在此等抗體中，發現12433、12947、10846及12931結合至FGFR2 IIIb同功異型物(Uniprot寄存號P21802-3)，發現10164、11725、10220、11723及12944結合至人類FGFR2 IIIb (Uniprot寄存號P21802-3)與IIIc同功異型物(Uniprot寄存號P21802-1)，且發現12425、12422、12439、10918、10923及11722結合至人類FGFR2 IIIb (Uniprot寄存號P21802-3)與IIIc同功異型物(Uniprot寄存號P21802-1)以及人類FGFR4 (Uniprot寄存號P22455)。

實例2：親和力測定

使用Biacore®技術、使用具有CM5感測晶片的Biacore® T100儀器(GE系統)測定抗體對FGFR2物種直系同源物以及對FGFR4的親和力。

簡言之，所有實驗皆使用補充有0.5 mg/mL BSA及10 µg/mL肝素的HBS-EP⁺ (0.01 M HEPES pH 7.4，0.15 M NaCl，0.005%界面活性劑P20)作為運作緩衝液。藉由反應單位(RU)度量固著程度及分析物相互作用。進行先導實驗以測試及確認抗人類Fc抗體固著及測試抗體捕捉的可行性。

進行動力學量測時，進行實驗，其中使抗體固著至感測晶片表面且測定表1中所列之上述FGFR蛋白在自由溶液中結合的能力。簡言之，50 µg/mL抗人類Fc抗體在pH 4.75、在所有四個流動池上、在每分鐘10 µl之流速下經由胺偶合反應而固著於CM5感測晶片上直至達到6000 RU。3 µg/mL測試抗體接著以10 µL/min注射10秒。抗體之固著程度一般保持低於250 RU。隨後，0.078-100 nM FGFR受體(2倍連續稀釋)以80 µL/min之流速歷時7分鐘注射於參考流動池與測試流動池上。隨後使用補充有0.5 mg/mL BSA及10 µg/ml肝素的HBS-EP⁺作為運作緩衝液使結合解離10分鐘。每次注射循環之後，用60 µL/min之10

mM甘胺酸(pH 2.0)使晶片表面再生70秒。所有實驗皆在25℃進行且將反應資料與簡單的1:1相互作用模型全面擬合(使用評估軟件1.1版(GE Systems))，以獲得結合速率(k_a)、解離速率(k_d)及親和力(K_D)之估算值。

針對FGFR2 IIIb物種直系同源物及FGFR4所得之親和力估算值之概要呈現於表4中。發現所有抗體結合至所評估FGFR2物種直系同源物且抗體亞型亦結合至人類FGFR4。另外，一些抗體(10846、12433、12931及12947)不能結合至人類FGFR2之IIIc同功異型物(Uniprot寄存號P21802)。所有抗體皆對FGFR2具有特異性或結合至FGFR2與FGFR4，且未發現抗體明顯結合至FGFR1或FGFR3。

表4.針對FGFR2 IIIb物種直系同源物及FGFR4所得的親和力估算值

抗體ID	親和力估算值(K_D) (M)				
	人類FGFR2 IIIb	小鼠FGFR2 IIIb	大鼠 FGFR2 IIIb	食蟹猴 FGFR2 IIIb	人類FGFR4
10164	1.9E-08	3.3E-08	3.5E-08	1.6E-08	N.B.
10220	1.6E-08	2.6E-08	2.6E-08	2.6E-08	N.B.
10846	1.4E-12	1.5E-08	1.3E-08	2.3E-08	N.B.
10918	7.7E-10	1.1E-09	1.3E-09	1.3E-09	1.8E-09
10923	3.7E-09	4.0E-09	5.5E-09	4.5E-09	6.4E-09
11722	1.3E-08	1.8E-08	2.1E-08	1.3E-08	1.1E-08
11723	1.8E-08	2.8E-08	5.3E-08	1.7E-08	N.B.
11725	2.6E-08	1.3E-07	1.4E-07	7.3E-09	N.B.
12422	5.1E-09	7.7E-09	9.7E-09	7.4E-09	9.5E-10
12425	1.4E-08	1.6E-08	2.2E-08	1.2E-08	3.9E-09
12433	5.6E-09	8.0E-09	1.2E-08	1.2E-08	N.B.
12439	1.5E-08	1.5E-08	1.6E-08	5.6E-09	4.3E-09
12931	3.4E-09	1.2E-09	2.9E-09	2.4E-09	N.B.
12944	9.4E-09	6.9E-09	1.1E-08	1.0E-08	N.B.
12947	2.7E-09	3.1E-09	5.1E-09	2.4E-09	N.B.

實例3：評估抗FGFR抗體之功能活性

使用Baf細胞系統(其中Baf細胞經轉導而過度表現FGFR2)評估純化抗體充當FGFR2之促效劑或拮抗劑的能力。

為了評估抗體之潛在促效特性，Baf-FGFR2細胞在PBS中洗滌兩次且再懸浮於稀釋培養基(RPMI，補充有10% FBS、2 μ g/mL肝素

(Sigma, 目錄#H3149)及20 µg/mL殺稻瘟菌素(例如Invitrogen, 目錄#A11139-03或Cellgro®, 目錄#30-100-RB))中, 隨後於90 µl稀釋培養基中以8000個細胞/孔接種於96孔盤(Costar目錄#3904)中。在各分析中, 一個盤指定為「第0日」盤: 向此等盤之各孔中添加額外10 µl稀釋培養基, 隨後每孔添加80 µl之Cell titer Glo®試劑(Promega #G7573)。分析盤輕輕振盪10分鐘且所得發光強度使用Perkin Elmer EnVision® 2101讀盤器量測。製備各抗體於稀釋培養基中之10倍連續稀釋溶液且向適當孔中添加10 µl。除測試抗體之外, 包括FGF1 (Peprotech, 目錄#100-17A; 最終分析濃度0-30 nM)、市購抗FGFR2抗體(R & D systems, 目錄# MAB6841)及非FGFR2結合抗體作為對照試劑。分析盤在37°C、在5% CO₂下培育3天。此培育之後, 歷時約30分鐘使分析盤恢復至室溫且每孔添加80 µl之Cell titer Glo®試劑(Promega #G7573)。分析盤接著輕輕振盪10分鐘且所得發光強度使用Perkin Elmer EnVision® 2101讀盤器量測。為測定抗體對細胞增殖的作用, 對重複實驗的原始發光值取平均值且與第0日對照進行比較。此等研究中未評估10846、11725及12439, 但所測試之其他抗體皆不能取代FGF1及維持細胞生長。資料概要呈現於圖2(A)/(B)中。

Baf細胞系統亦用於評估抗體充當FGFR2受體信號傳導拮抗劑的潛力。在此等研究中, 如上文促效作用研究所述, 經由添加30 µg/ml FGF1 (Peprotech, 目錄#100-17A)至稀釋培養基中而塗鋪Baf-FGFR2細胞。製備各抗體於含有30 µg/mL FGF1之稀釋培養基的4倍連續稀釋溶液且向適當孔中添加25 µl。除測試抗體之外, 包括市購抗FGFR2抗體(R & D systems, 目錄#MAB6841)及非FGFR2結合抗體作為對照試劑。分析盤在37°C、在5% CO₂下培育3天。此培育之後, 歷時約30分鐘使分析盤恢復至室溫且每孔添加80 µl之Cell titer Glo®試劑(Promega #G7573)。分析盤接著輕輕振盪10分鐘且所得發光強度使

用Perkin Elmer EnVision® 2101讀盤器量測。為測定抗體對相對細胞增殖的作用，對重複實驗的原始發光值取平均值且進行比較。此等研究中未評估10846、11725及12439。所測試之其他抗體的作用呈現於圖3(A)/(B)中且證明所評估之純系10918、10923、12931、12944、12947及12422在小於100 nM之濃度下對工程化Baf細胞增殖的抑制大於50%。

實例4：製備ADC

一步法製備DM1結合物

結合反應開始之前，使抗體12425經由切向流過濾(TFF#1)滲濾至反應緩衝液(15 mM磷酸鉀，2 mM EDTA，pH 7.6)中。隨後，將抗體12425 (5.0 mg/mL)與DM1 (相對於抗體量為5.6倍莫耳過量)混合，且接著與SMCC (相對於抗體量為4.7倍過量)混合。反應在20℃、在15 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.6)中進行約16小時，該緩衝液含有2 mM EDTA及10% DMA。藉由添加1 M乙酸將pH調節至5.50來淬滅反應。pH調節之後，反應混合物經由多層(0.45/0.22 µm) PVDF過濾器過濾且純化且使用切向流過濾(TFF#2)滲濾至含有8.22%蔗糖的20 mM丁二酸鹽緩衝液(pH 5.0)中。用於切向流過濾之儀器參數列於下表5中。

表5.用於切向流過濾之儀器參數

TFF參數	TFF#1設定點	TFF#2設定點
體積濃度(Cb - g/L)	20	20
TMP (psi)	12-18	12-18
饋入流速(LMH)	324	324
膜負荷(g/m2)	110 - 150	110 - 150
滲濾體積	10	14
滲濾緩衝液	15 mM磷酸鉀, 2 mM EDTA, pH 7.6	20 mM丁二酸鹽, 8.22%蔗糖, pH 5.0
溫度(°C)	RT (20 - 25)	RT (20 - 25)

上述方法所得的結合物如下進行分析：細胞毒性劑負荷(類美登素與抗體比率，MAR)使用UV光譜學；測定結合物單體使用SEC-

HPLC；且游離類美登素百分比使用逆相HPLC或疏水性遮蔽相(Hisep)-HPLC。資料顯示於表6中。

表6. 12425-MCC-DM1之特性

樣品	MAR	單體(%)	總游離類美登素 (%)
12425-MCC-DM1	3.6	98.0	1.0

原位法製備DM1結合物

本發明之結合物亦可藉由原位方法、根據以下程序製備。使用4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)連接子使抗體(21個純系)與DM1結合。製備DM1及Sulfo-SMCC雜二官能性連接子於DMA中的儲備溶液。在25℃，使Sulfo-SMCC與DM1硫醇一起混合於含有40% v/v 50 mM丁二酸鹽水性緩衝液、2 mM EDTA pH 5.0的DMA中反應10分鐘，其中DM1與連接子之比率為1.3:1莫耳當量且DM1最終濃度為1.95 mM。接著使抗體與反應物之等分樣品反應，在2.5 mg/mL Ab於50 mM EPPS (pH 8.0)及10% DMA (v/v)中的最終結合條件下，得到約6.5:1之SMCC與Ab之莫耳當量比率。在25℃約18小時之後，使用經10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)平衡的SEPHADEX™ G25管柱純化結合反應混合物。

表7. DM1-抗體結合物之特性

純系名稱	連接子過量	MAR	單體(%)	產率(%)	游離藥物(%)
10164	6.8	3.5	98	88	<0.5
10220	7.5	3.55	98	96	0.5
10553	6.4	3.7	100	64	<0.5
10554	6.3	3.5	100	79	<0.5
10846	6.3	3.4	99	71	<0.5
10918	6.4	3.6	98	99	0.5
10923	6.2	3.5	100	95	0.7
10925	7.9	3.5	99	70	<0.5

11722	9.5	3.5	99	84	3.7
11723	7.3	3.3	99	64	<0.5
11725	8.2	3.4	99	74	<0.5
11729	9.5	3.2	93	30	0.7
12422	6.2	4.0	99	60	<0.5
12425	6.1	3.5	99	70	<0.5
12433	6.1	3.4	99	82	<0.5
12435	7.0	3.4	99	75	<0.5
12438	7.7	3.4	99	75	<0.5
12439	6.4	3.5	99	99	0.5
12931	6.4	3.8	99	80	0.5
12944	7.8	3.5	99	38	1.6
12947	6.7	3.8	99	99	<0.5

用SPDB連接子製備ADC

抗體12422、12425及12433 (8 mg/mL)在含有50 mM NaCl、2 mM EDTA及5% DMA的50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)中、在25°C用4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB，分別為5.0倍、5.5倍及4.9倍莫耳過量)修飾120分鐘。所修飾之Ab不經純化即隨後在含有50 mM NaCl、2 mM EDTA及5% DMA的50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)中、在25°C、以4 mg/mL之最終修飾抗體濃度與DM4結合(相對於未結合連接子為1.7倍莫耳過量) 18小時。使用經10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)平衡及溶離的SEPHADEX™ G25管柱純化結合反應混合物。

表8. DM4-抗體結合物之特性

純系名稱	連接子過量	MAR	單體(%)	產率(%)	游離藥物(%)
12422	5.0	3.6	99	85	0.5
12425	5.5	3.6	98	>90	<0.5
12433	4.9	4.0	99	75	0.5

用CX1-1連接子製備ADC

將抗體12425 (5.0 mg/mL)與DM1 (相對於抗體量為7.15倍莫耳過量)混合，且接著與CX1-1 (相對於抗體量為5.5倍過量)混合。反應在含有2 mM EDTA及5% DMA的60 mM EPPS [4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸]緩衝液(pH 8.5)中、在25°C 進行約16小時。接著使用在10 mM 丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)中平衡及溶離的SEPHADEX™ G25管柱純化反應混合物。

表9. CX1-1/DM1與12425之結合物的特性

純系名稱	連接子過量	MAR	單體(%)	產率(%)	游離藥物(%)
12425	5.5 X	3.4	97	>90	0.1

實例5：ADC相對於親本抗體之親和力

抗體與SMCC-DM1結合之後對FGFR2及FGFR4的親和力係使用Biacore®技術、使用Biacore® T100儀器(GE Systems)及CM5感測晶片、使用類似於上文實例2所述的方法測定。

對於所評估抗體而言，SMCC-DM1抗體結合物結合至人類FGFR2 IIIb的親和力估算值與非結合親本抗體類似，表明結合對抗體結合的影響不明顯(表10)。

表10.非結合抗體及SMCC-DM1抗體結合物之親和力估算值

抗體ID	人類FGFR2 IIIb親和力(K _D) (nM)	
	非結合抗體	抗體-MCC-DM1
10164	2	2.6
10220	17	7.8
10846	3.5	3.8
10918	2.2	2.1
10923	2.2	2.3
11722	4.3	8.8
11723	6.6	5.9
11725	3.3	2.9
12422	5.1	N.D.
12425	2.1	2.3
12433	5.6	4.9
12439	15	N.D.
12931	3.4	N.D.
12944	9.4	N.D.
12947	2.7	N.D.

N.D. = 未測定

另外，測定若干種SMCC-DM1抗體結合物對FGFR2及FGFR4物種直系同源物的親和力。此等研究中，發現抗體結合物與非結合抗體之間在親和力方面不存在明顯的差異(表11)。

表11. SMCC-DM1抗體結合物對FGFR2及FGFR4物種直系同源物的親和力

蛋白質	親和力(K _D) (nM)					
	12433	12433-MCC-DM1	10164	10164-MCC-DM1	12425	12425-MCC-DM1
人類FGFR 2IIIb	5.6	4.9	2	2.6	2.1	2.3
小鼠FGFR2 IIIb	2.2	1.2	10	10	3.2	3.6
大鼠FGFR2 IIIb	3.7	2.8	2.8	3.5	3.1	3.5
食蟹猴FGFR2 IIIb	1.7	1.5	9	3.8	1.6	1.9
人類FGFR4	未結合	N.D.	未結合	N.D.	4.0	4.6
小鼠FGFR4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.6	2.2
大鼠FGFR4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.2	4.2
食蟹猴FGFR4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.3	2.1

N.D. = 未測定

實例6：ADC對SNU16及Kato-III細胞的活體外活性

與SMCC-DM1連接子-有效負荷結合之後，測定抗體藥物結合物(ADC)抑制FGFR2擴增性細胞株SNU16 (ATCC目錄#CRL-5974)及Kato-III (ATCC目錄#HTB-103)增殖的能力。簡言之，使細胞在培養基中、在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下培養，如供應商所建議。分析當天，細胞用PBS (Lonza，目錄#17516C)洗滌兩次，隨後用0.25%胰蛋白酶-EDTA (Gibco®，目錄#25300)處理5分鐘且再懸浮於所建議培養基中。接著對細胞計數且於100 µl細胞培養基中以2600-3600個細胞/孔之密度接種於96孔盤(Costar目錄#3940或Corning®目錄#3340)中。針對第0日量測產生雙重複盤且所有盤均在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下培育隔夜。亦產生僅含培養基的孔以充當陰性對照。此培育之後，向第0日盤中每孔添加50 µl Cell titer Glo®

試劑(Promega目錄#G7573)，接著輕輕振盪10分鐘且所得發光強度使用Perkin Elmer EnVision® 2101讀盤器量測。測試ADC在適當細胞培養基中雙重複連續稀釋而得到2倍儲備溶液，且自其餘各分析盤中移除50 μ l培養基之後，添加50 μ l 2倍連續稀釋ADC (最終分析濃度0.2-50 nM DM1等效物)，隨後在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下培育5天。此培育期之後，如上所述經由添加Cell titer Glo®試劑來測定相對細胞生存力。ADC對細胞增殖的作用係使用雙重複實驗之平均值如下計算：

$$\text{抑制}\% = (\text{ADC處理} - \text{未處理}) / (\text{未處理} - \text{第0日}) * 100$$

將抑制%資料與4參數邏輯方程式擬合且測定IC₅₀值。與IgG對照物ADC不同，發現所測試ADC為Kato-III與SNU16細胞增殖之強抑制劑，其IC₅₀小於3 nM (表12)。

表12. MCC-DM1 ADC之抗體效能

抗體ID	細胞增殖IC ₅₀ (nM)	
	Kato-III	SNU16
10164	1.6	0.5
10220	0.33	<0.2
10846	0.43	<0.2
10918	0.61	<0.2
10923	0.45	<0.2
11722	0.59	<0.2
11723	0.91	<0.2
11725	5.2	5
12422	< 3	< 3
12425	0.15	< 0.2
12433	< 3	< 3
12439	< 3	< 3
12931	< 3	< 3
12944	< 3	< 3
12947	< 3	< 3
IgG對照ADC	>50	>25

亦評估經由SPDB-DM4連接子-有效負荷結合之若干種抗FGFR抗體的能力。如上所述進行的此等研究揭示，呈SPDB-DM4 ADC形式的

所評估抗體亦為細胞增殖之強抑制劑，表明能夠成功地遞送有效負荷以殺死細胞者不限於MCC-DM1。SNU16細胞株之資料總結於表13中。

表13. SPDB-DM4 ADC之抗體效能

抗體ID	細胞增殖IC50 (nM)
12422	0.07
12425	0.04
12433	0.8
IgG對照物ADC	>25

實例7：評估抗FGFR2/4 ADC之活體內活性

評估15種抗FGFR2或抗FGFR2/FGFR4交叉反應性ADC在FGFR2擴增(CN=31)之表現FGFR2 IIIb同功異型物的SNU16異種移植腫瘤之胃模型中的抗腫瘤活性。在兩個獨立研究中，將 10×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠中，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液(Hank's balanced salt solution)中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。第一研究中募集植入後第八天平均腫瘤體積為192.9 mm^3 的小鼠。隨機分入九組之一(n=8/組)之後，向小鼠投與PBS或單一靜脈內(i.v.)注射3 mg/kg以下抗體藥物結合物之一：12433-MCC-DM1、10164-MCC-DM1、10220-MCC-DM1、10918-MCC-DM1、10923-MCC-DM1、11722-MCC-DM1、12422-MCC-DM1或12425-MCC-DM1。第二研究中募集植入後第七天平均腫瘤體積為223.4 mm^3 的小鼠。隨機分入九組之一(n=8/組)之後，向小鼠投與PBS或單一靜脈內注射3 mg/kg以下抗體藥物結合物之一：12433-MCC-DM1、12947-MCC-DM1、12931-MCC-DM1、12944-MCC-DM1、12439-MCC-DM1、10846-MCC-DM1、11725-MCC-DM1或11723-MCC-DM1。包括12433-MCC-DM1作為兩次研究之間的過渡，以有利於在兩次研究中直接比較抗體藥物結合物。腫瘤每週測徑兩次。此等研究中所評估之ADC在給藥後第23天至24天展現廣譜抗腫

瘤活性(範圍為33.2% T/C至77.8%消退) (圖4(A)及4(B))。

評估基於可分裂二硫化物連接子之SPDB-DM4 FGFR2 ADC在SNU16異種移植瘤模型中的抗腫瘤活性。在此等研究中，將 10×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠中，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigelTM (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。研究募集植入後11天平均腫瘤體積為223 mm³的小鼠。隨機分入五組之一(n=7/組)之後，向小鼠投與PBS (10 ml/kg)、單一靜脈內注射15 mg/kg 12433-MCC-DM1或對照IgG-MCC-DM1，或單一靜脈內注射5 mg/kg之12433-SPDB-DM4或IgG-SPDB-DM4。腫瘤每週測徑兩次。在此研究中，對照ADC均未展現抗腫瘤活性(圖4(C))。然而，相比之下，12433-MCC-DM1與12433-SPDB-DM4在所投與之劑量下均具有針對SNU16異種移植瘤模型的高度活性，表明抗FGFR ADC之抗腫瘤作用可經由不同連接子獲得。

單一靜脈內給予3 mg/kg劑量之後，評估抗FGFR ADC在含有SNU16腫瘤之小鼠中的藥物動力學(PK)。在給藥後1小時、24小時、72小時、168小時及336小時收集PK樣品。在所有研究中，使用經驗證的ELISA方法量測「總」抗體與「抗體藥物結合物(ADC)」在所有動物物種中的血清濃度。「總」分數係指與DM1結合或不結合之抗體的量測值，而ADC分數僅指DM1與抗體結合物量的量測值(≥ 1 個DM1分子)。在所有研究中，ADC之清除率與總抗體分數之間未觀測到明顯的差異。ADC之PK特性之概要呈現於圖4(D)-(E)。單一3 mg/kg劑量之後，當含有SNU16腫瘤之小鼠中的ADC清除率與所觀測之抗腫瘤作用比較時，發現具有最大抗腫瘤活性(>40%腫瘤消退)之ADC皆以小於45 ml/d/kg之速率清除(圖4(F))。

實例8：使用FGFR2擴增之細胞株評估非結合抗體及結合抗體的活體外信號傳導活性

評估非結合及結合SMCC-DM1之抗FGFR2抗體在FGFR2擴增之細胞株中調節FGFR信號傳導的能力。在初始研究中，測定12433、12425及10164抗體對SNU16 (ATCC目錄#CRL-5974)細胞的作用。簡言之，細胞於補充有10% FBS之RPMI中接種於12孔CellBind™盤(Costar目錄#3336)中且在組織培養恆溫箱中、在37℃及5% CO₂下培育隔夜。實驗當天，吸出細胞培養基且用測試抗體或小分子FGFR抑制劑BGJ398置換，該等測試抗體或小分子FGFR抑制劑BGJ398皆在補充有10% FBS的RPMI中稀釋(抗體/ADC最終濃度為13-130 nM；BGJ398最終濃度為500 nM)。細胞接著在組織培養恆溫箱中、在37℃及5% CO₂下培育2小時。此培育之後，細胞用冷PBS (Lonza，目錄#17516C)洗滌兩次，置放於冰上且添加300 µl溶胞緩衝液(CST目錄#9803)，該溶胞緩衝液具有PhosphoSTOP (Roche目錄#04906237001)。藉由BCA分析(Pierce目錄#23228)測定蛋白質濃度。60 µg蛋白質接著藉由SDS-PAGE解析，轉移至硝化纖維膜上且用針對pFRS2 (Cell Signaling Technology，目錄#3861)、總FGFR2 (例如Santa Cruz Biotechnology，目錄#SC-122或R & D systems目錄#6841)及β-肌動蛋白(Bethyl，目錄#A300-485A)或細胞角蛋白(Dako目錄#M3515)的抗體探測。結果呈現於圖5(A)中且發現在2小時時，非結合或呈MCC-DM1 ADC形式之抗體均不能調節pFRS2信號。使用12425抗體(4.3 nM)及12425-MCC-DM1 ADC (4.3 nM抗體，13 nM DM1等效物)進行進一步實驗，其中對SNU16與Kato-III (ATCC目錄#HTB-103)細胞評估其他時間點(4小時、24小時及72小時)。結果呈現於圖5(B) (SNU16)及5(C) (Kato-III)中。觀測到裸抗體或ADC長達48小時對SNU16細胞或長達72小時對Kato-III細胞無作用。12425-MCC-DM1處理之後，在72小時時觀測到SNU16細胞中之pFRS2與tFGFR2信號相對於細胞角蛋白均減少。如下文實例9中所述，12425-MCC-DM1為72小時時間點時

SNU16增殖之強抑制劑且此降低可能反映SNU16細胞群體中FGFR2表現之異質性。

實例9：評估ADC及非結合抗體對細胞增殖的作用

評估非結合及結合SMCC-DM1之抗FGFR抗體抑制一組FGFR2經擴增、過度表現且剔除式細胞株增殖的能力。在此等研究中，使細胞在培養基中、在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下培養，如供應商所建議。分析當天，細胞用PBS (Lonza，目錄#17516C)洗滌兩次，隨後用0.25%胰蛋白酶-EDTA (Gibco®，目錄#25300)處理5分鐘且再懸浮於所建議培養基中。接著對細胞計數且於55-100 µl細胞培養基中以800-3600個細胞/孔之密度接種於96或384孔盤(Costar目錄#3940，Corning®目錄#3340，Costar目錄#3707)中。針對第0日量測產生雙重複盤且所有盤均在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下培育隔夜。亦產生僅含培養基的孔以充當陰性對照。此培育之後，向第0日盤中每孔添加30-50 µl Cell titer Glo®試劑(Promega目錄#G7573)，接著輕輕振盪10分鐘且所得發光強度使用Perkin Elmer EnVision® 2101讀盤器量測。測試ADC於適當細胞培養基中雙重複連續稀釋至2倍或10倍儲備溶液。對於使用2倍ADC儲備溶液的分析而言，移除一半分析培養基且用等體積之2倍連續稀釋ADC置換。在使用10倍ADC儲備溶液的情況下，其於分析盤中1:10稀釋(例如5 µl至55 µl)，隨後在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO₂下培育5天或6天。ADC之最終分析濃度在0.005-100 nM DM1等效物範圍內。此培育期之後，如上所述經由添加Cell titer Glo®試劑來測定相對細胞生存力。ADC對細胞增殖的作用係使用雙重複實驗之平均值如下計算：

$$\text{抑制}\% = (\text{ADC處理} - \text{未處理}) / (\text{未處理} - \text{第0日}) * 100$$

將抑制%資料與4參數邏輯方程式擬合且測定IC₅₀值。12425-MCC-DM1之代表資料呈現於圖6(A)中。發現此ADC為SNU16 (圖

6(A))與Kato-III FGFR2擴增之細胞株(圖6(B))之細胞增殖的強抑制劑。此等細胞株均經確認對類美登素有效負荷(L-Me-DM1；游離DM1，圖6(A)-(C))敏感，但對非靶向ADC (針對小雞溶菌酶)不敏感，該非靶向ADC以類似的類美登素抗體比率經由SMCC-DM1結合。12425-MCC-DM1亦不具有針對胃癌細胞株NUGC3的活性，該細胞株缺乏明顯的FGFR2表現，但對類美登素有效負荷敏感(圖6(C))。另外，發現非結合抗體12425對SNU16 (圖6(D))與Kato-III細胞(資料未顯示)均缺少抗增殖活性。若干種抗FGFR-MCC-DM1 ADC對FGFR2擴增之細胞株(包括SNU16、Kato-III、SUM-52、MFM223及H716細胞)之抗增殖活性的概要(Kunii等人, 2008 Cancer Res 68: 2340-2348；Turner等人, 2010 29: 2013-2023；Mathur等人, 2010. Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 海報# 284)顯示於表14中。另外，發現ADC皆不具有針對一組腫瘤細胞株的活性，該組腫瘤細胞株包括AZ521、CAL-51、KYSE-150、TE-6、SNU-1041、TT、CHL-1、G401及HEC59。

表14. 若干種抗FGFR-MCC-DM1 ADC對FGFR2基因擴增及非擴增之細胞株的抗增殖活性

細胞株	譜系	FGFR2擴增? (同功異型物)	活體外效能(IC ₅₀ , nM, 游離DM1等效物)			
			12433-DM1	10164-DM1	12425-DM1	IgG-DM1
SNU16	胃	是(IIIb)	0.08	0.04	0.03	11
Kato-III	胃	是(IIIb)	0.28	0.32	0.34	30
SUM-52	乳房	是(IIIb)	0.29	0.14	0.17	>30
MFM223	乳房	是(IIIb)	24	3.5	1	>30
H716	結腸	是(IIIc)	>30	1.7	0.1-0.7	>30
NUGC3	胃	No (IIIb)	>30	>30	>30	>30

實例10：FGFR ADC之活體內PK-PD

進行研究以評估12425-MCC-DM1活體內調節藥效學標記的能力。此等研究之目的為評估FGFR2或FGFR4表現與G2/M細胞週期停

滯之間的關係。pHH3陽性核之累積(如藉由免疫組織化學所評估)用作G2/M停滯之標記。

經對應於人類組蛋白H3之Ser10周圍殘基之合成磷肽免疫的動物所產生的兔多株抗體獲自Cell Signaling Technology (Danvers, MA)。簡言之，IHC方案包括加熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning#1抗原修復試劑。第一抗體稀釋至1:100且在37°C培育60分鐘。隨後，與Ventana OmniMap預稀釋HRP結合抗兔抗體(目錄#760-4311)一起培育4分鐘。

為評估FGFR2擴增之SNU16異種移植物模型的PD，將 10×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigelTM (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。一旦腫瘤達到300 mm³至500 mm³ (n=3/組)，則六隻小鼠隨機分配以接受靜脈內劑量之12425-MCC-DM1 (10 mg/kg)或PBS (10 ml/kg)。與類美登素有效負荷之預期作用機制一致，給藥後24小時，相對於PBS處理之對照組，12425-MCC-DM1使核pHH3陽性產生明顯的時間依賴性增強(代表性影像顯示於圖7(A)中)。亦評估所分裂卡斯蛋白酶3的時間依賴性變化。在此等研究中，經對應於與人類卡斯蛋白酶3相鄰之胺基末端殘基(Asp175)之合成肽免疫的動物所產生的兔多株抗體獲自Cell Signaling Technology (Danvers, MA)。IHC方案包括不加熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning#1抗原修復試劑。第一抗體稀釋至1:300且在室溫下培育60分鐘。隨後，與Ventana OmniMap預稀釋HRP結合抗兔抗體(目錄#760-4311)一起培育4分鐘。類似於pHH3，亦觀測所分裂之卡斯蛋白酶3的時間依賴性變化(圖7(A))。對於其他抗FGFR2 ADC，例如12433-MCC-DM1，亦獲得類似資料。

為了評估ADC特異性，評估FGFR2/FGFR4陰性NUGC3異種移植

物模型的PD。在此等研究中，將 1×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠中，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences) 於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。一旦腫瘤達到300 mm³至500 mm³ (n=3/組)，則九隻小鼠隨機分配以接受單一靜脈內15 mg/kg劑量之12425-MCC-DM1、對照IgG-MCC-DM1或PBS (10 ml/kg)。在FGFR2及FGFR4陰性NUGC3異種移植物中，相對於15 mg/kg靜脈內劑量之對照IgG-MCC-DM1，12425-MCC-DM1不能調節pHH3含量(代表性影像顯示於圖7(B)中)。對於其他抗FGFR2 ADC，例如12433-MCC-DM1，亦獲得類似資料。

總而言之，此等資料證明12425-MCC-DM1能夠活體內引發強細胞PD效應，此等效應與FGFR2或FGFR4表現相關且與類美登素有效負荷之作用機制一致。

實例11：抗FGFR ADC之活體內功效

評估抗FGFR2及/或抗FGFR2/4 ADC在若干種腫瘤異種移植物模型中之抗腫瘤活性。

FGFR2基因組擴增之異種移植物模型

模型1：評估三種抗FGFR2或抗FGFR2/FGFR4雙重靶向ADC在FGFR2擴增(複本數=31，SNP6.0)、表現FGFR2 IIIc同功異型物之NCI-H716結腸直腸異種移植腫瘤之胃模型中的抗腫瘤活性。將含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液中之 5×10^6 個細胞皮下植入雌性裸小鼠中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。

研究中募集植入後四天平均腫瘤體積為171.7 mm³的小鼠(圖8(A))。隨機分入八組之一(n=6/組)之後，向小鼠投與PBS (10 ml/kg)、單一靜脈內劑量之對照IgG-MCC-DM1 (15 mg/kg)、12422-MCC-DM1 (5或15 mg/kg)、12425-MCC-DM1 (5或15 mg/kg)或10164-

MCC-DM1 (5或15 mg/kg)。腫瘤每週測徑兩次。對照IgG-MCC-DM1在15 mg/kg下無活性。10164-MCC-DM1在5 mg/kg下無活性。10164-MCC-DM1 (15 mg/kg)、12422-MCC-DM1 (5 mg/kg及15 mg/kg)及12425-MCC-DM1 (5 mg/kg及15 mg/kg)在給予後14天期間展現類似活性。12425-MCC-DM1 (5 mg/kg及15 mg/kg)及10164-MCC-DM1 (僅15 mg/kg)在給予後18天期間產生最持久的反應(分別為23%、21%及31% T/C)。

模型2：亦評估三種抗FGFR2或抗FGFR2/FGFR4 ADC在FGFR2擴增之表現FGFR2 IIIb同功異型物之MFM223 ER/PR/Her2陰性乳房異種移植腫瘤模型中的劑量反應抗腫瘤活性。MFM223模型以基於片段之模型建立。片段植入前一天，將0.72 mg持續釋放60天之17 β -雌二醇丸粒(Innovative Research of America)皮下植入雌性裸小鼠中以維持血清雌激素含量。17 β -雌二醇丸粒植入後之第一天，將自供體小鼠收穫的異種移植物切成3×3 mm³片段，皮下植入受者雌性裸小鼠中。研究中募集植入後21天平均腫瘤體積為208.4 mm³的小鼠(圖8(B))。隨機分入五組之一(n=8/組)之後，向小鼠投與PBS (10 ml/kg)或單一10 mg/kg靜脈內劑量之對照IgG-MCC-DM1、12433-MCC-DM1、10164-MCC-DM1或12425-MCC-DM1。腫瘤每週測徑兩次。IgG-MCC-DM1在此模型中無活性。投與後18天，單一10 mg/kg靜脈內劑量之12433-MCC-DM1、12425-MCC-DM1及10164 - DM1產生37%、24%及7% T/C。

模型3：亦評估12425-MCC-DM1作為單一藥劑在FGFR2擴增之患者源原發胃腫瘤異種移植物模型CHGA-010 (FGFR2複本數=48，(SNP6.0))中的活性。在此等研究中，將含有50%無苯酚紅matrigelTM (BD Biosciences)之DMEM中的3x3x3 mm腫瘤片段皮下植入雌性nu/nu無胸腺小鼠中。腫瘤占位率> 50%且在植入後4週達到約250 mm³。單一劑量之10 mg/kg IV 12425-MCC-DM1之後，在給藥後約16至20天期

間達成腫瘤停滯(圖8(C))。FGFR2特異性ADC 12433-MCC-DM1亦獲得類似單一劑量資料(資料未顯示)。另外，接受10 mg/kg q3w*2 IV的群組在首次給藥後37天期間大致維持腫瘤停滯，而接受單一10 mg/kg劑量的群組在首次給藥後37天時平均為1588 mm³。此等資料證明CHGA010異種移植物對12425-MCC-DM1之第二劑量能夠有反應。

具有正常FGFR2及/或FGFR4複本數的異種移植物模型

亦評估12425-MCC-DM1在具有正常FGFR2複本數及多種FGFR2及FGFR4 mRNA表現的二十三個人類肺原發瘤異種移植物及二十二個人類乳房原發瘤異種移植物中的抗腫瘤活性。藉由將人類肺原發瘤片段皮下植入雌性裸小鼠中來建立人類原發異種移植物模型。藉由將3 mm³片段皮下植入雌性裸小鼠中來使所得腫瘤異種移植物活體內繼代。將腫瘤片段植入動物且依照先達到條件先募集原則(亦即一旦腫瘤達到約250 mm³，而非必需在腫瘤片段植入後的相同時間達到)分入處理組(未處理組或12425-MCC-DM1，15 mg/kg i.v. q2w)。兩個處理組每種異種移植物模型各分配一個動物。腫瘤每週測徑兩次且分析腫瘤體積變化百分比資料。

二十三個肺原發瘤異種移植物模型中有八個且二十二個乳房原發瘤異種移植物模型中有八個對12425-MCC-DM1有反應。反應範圍為短暫腫瘤生長抑制至腫瘤異種移植物完全消退。對12425-MCC-DM1有反應之一個肺原發瘤異種移植物模型及一個乳房原發瘤異種移植物模型之實例分別顯示於圖8(D)及8(E)中。總而言之，資料證明FGFR2或FGFR4 mRNA表現提高之人類肺及乳房原發瘤異種移植物的活體內生長可藉由12425-MCC-DM1治療加以抑制。

亦評估抗FGFR2/FGFR4 ADC 12425-MCC-DM1在表現FGFR2但具有基因之正常複本數的乳房異種移植物模型中的劑量反應抗腫瘤活性。模型係以來自52歲乳腺管癌女性的基於片段之異種移植物模型建

立，且在雌性裸小鼠中擴增。將自供體小鼠收穫的異種移植物切成 $3 \times 3 \text{ mm}^3$ 片段且皮下植入受者雌性裸小鼠中，補充 0.0085 mg/ml 17β -雌二醇增濃水以維持血清雌激素含量且支持異種移植物生長。研究中募集植入後26天平均腫瘤體積為 198 mm^3 的小鼠。隨機分入三組之一 ($n=6/\text{組}$) 之後，向小鼠投與單一 15 mg/kg 靜脈內劑量之對照 IgG-MCC-DM1 或單一 15 mg/kg 或 5 mg/kg 靜脈內劑量之 12425-MCC-DM1 (圖 8(F))。腫瘤每週測徑兩次。單一 15 mg/kg 靜脈內劑量之 12425-MCC-DM1 產生 6.5% T/C，而 5 mg/kg 劑量無活性。此等資料證明 12425-MCC-DM1 在無基因擴增之表現 FGFR2 的腫瘤中的效用。

總而言之，此等模型證明 12425-MCC-DM1 在腫瘤中的效用，該等腫瘤在 FGFR2 基因擴增存在或不存在下、在細胞表面上表現 FGFR2。

實例12：具有小分子FGFR抑制劑BGJ398 (亦稱為3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲)之FGFR ADC的抗腫瘤活性提高

評估 FGFR2/4 抗體藥物結合物 12425-MCC-DM1 單獨及與 FGFR 小分子酪胺酸激酶抑制劑 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲 (Guagnano 等人, 2011 J Med Chem 54: 7066-7083) 組合在 FGFR2 擴增之 CHGA119 患者源原發胃腫瘤異種移植物模型 (FGFR2 複本數 = 22 (SNP6.0)) 中的抗腫瘤活性。在此等研究中，將尺寸為 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 的 CHGA119 腫瘤片段皮下 (s.c.) 植入雌性 nu/nu 無胸腺小鼠中。植入後四十天，具有 CHGA119 腫瘤的小鼠 ($n=8$ ，平均 251 mm^3 ；範圍： $104\text{-}382 \text{ mm}^3$) 分別用以下處理：經口管飼之媒劑 (含有 50% PEG300 之乙酸/乙酸鹽緩衝液) (pH 4.6, 10 ml/kg , p.o., qd)；對照 IgG-3207-DM1 (10 mg/kg , i.v., q2wk)；12425-MCC-DM1 (10 mg/kg , i.v., q2wk)；3-(2,6-二氯-

3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲磷酸鹽(10 mg/kg, p.o., qd); 或12425-MCC-DM1與3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲磷酸鹽之組合。腫瘤每週測徑兩次。12425-MCC-DM1及3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲磷酸鹽作為單一藥劑各自引起腫瘤停滯或部分反應(分別為T/C = 4%或33%, $p < 0.05$), 而12425-MCC-DM1與3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲磷酸鹽組合治療在治療5週之後誘使腫瘤接近完全消退(消退率=-94%, $p < 0.05$) (參見圖9及表15)。單一藥劑或組合治療之後, 觀測到小於10%體重降低(表15)。此等資料表明, FGFR ADC與FGFR信號傳導小分子抑制劑(例如3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲磷酸鹽、TKI258、普納替尼、AZD4547)組合可提高抗腫瘤反應。

表15. 抗FGFR藥劑對具有CHGA119腫瘤之小鼠中之腫瘤及宿主參數的作用

治療	腫瘤反應			宿主反應		
	T/C (%)	消退率 (%)	平均腫瘤體積變化($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)	平均體重變化 ($\text{g} \pm \text{SEM}$)	體重變化% (mean \pm SEM)	存活率 (存活者數/總數)
媒劑	100	-	1168 \pm 204	-1.3 \pm 0.3	-5.7 \pm 1.4	8/8
IgG-MCC-DM1	111	-	1301 \pm 243	-1.7 \pm 0.6	-7.6 \pm 2.7	8/8
12425-MCC-DM1	4	-	43 \pm 35	0.6 \pm 0.2	2.5 \pm 1.0	8/8
BGJ398磷酸鹽	33	-	386 \pm 169	-0.8 \pm 0.7	-3.7 \pm 3	8/8
12425-MCC-DM1+BGJ398	-	94	-223 \pm 32	-3.7 \pm 3.8	-4.3 \pm 3.8	7/8

實例13：劑量分級對FGFR ADC之活體內功效的影響

為更好地瞭解12425-MCC-DM1 C_{max} (峰值暴露量)或 C_{avg} (給藥間隔期間之平均暴露量)在其抗腫瘤活性方面所起的作用, 使用SNU16異種移植物模型進行時間劑量分級實驗。研究給藥時程間隔時間的範

圍及在固定治療持續時間期間產生預測之固定總暴露量的劑量位準。在某些劑量位準下，FGFR2 ADC因TMDD而展現非線性的PK (參見實例19)。因此，為了維持所有給藥時程間隔期間的固定總暴露量，在依較低較頻繁給藥時程投藥時，需要可預測12425-MCC-DM1之較大總劑量的PK模型，因為TMDD在較低劑量下更明顯。PK模型預測，以3 mg/kg q3w*2、2.5 mg/kg q2w*3、1.5 mg/kg qw*6及0.7 mg/kg q3d*14投與的12425-MCC-DM1達成類似的總暴露量。

將 10×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠中，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigelTM (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。第一研究中募集植入後十天平均腫瘤體積為181.7 mm³的小鼠。

為了評估PK參數，經由尾部劃痕或眶後放血來收集血清且經由ELISA分析。總抗體PK分析係在DM1存在/不存在下藉由比色ELISA量測總抗體濃度。用抗人類IgG (Fc特異性)塗佈盤，且使用驢抗人類IgG-HRP進行偵測，隨後用適當讀盤器讀取。結合物PK分析係藉由比色ELISA量測結合至至少1個DM1分子的抗體。在此格式中，用抗DM1抗體塗佈盤，且用驢抗人類IgG-HRP進行偵測。在首次給藥後之以下時間點收集血清：3 mg/kg q3w*2 (2, 6, 24, 48, 96, 168, 240, 336, 503 h)；2.5 mg/kg q2w*3 (2, 6, 24, 48, 96, 168, 240, 335, 503 h)；1.5 mg/kg qw*6 (2, 6, 24, 48, 96, 167, 335, 503, 671, 839 h)；0.7 mg/kg q3d*14 (2, 6, 24, 48, 71, 143, 215, 287, 359, 431, 503, 575, 647, 719, 791, 863, 935 h)。

隨機分入五組之一(n = 7/組)之後，向小鼠投與PBS (10 ml/kg)或12425-MCC-DM1，12425-MCC-DM1係以3 mg/kg q3w*2、2.5 mg/kg q2w*3、1.5 mg/kg qw*6或0.7 mg/kg q3d*14靜脈內投與。如所預期，所有治療方案之C_{max}變化，而C_{avg}不變(表16)。所有治療方案皆具活

性且產生類似的腫瘤生長抑制，表明12425-MCC-DM1之平均暴露量為抗腫瘤活性之主要驅動因素(圖10)。此等發現指示臨床中可使用多種給藥時程而不會降低功效。

表16. 12425-MCC-DM1以不同劑量及時程投與具有SNU16腫瘤之小鼠之後的PK參數

給藥方案	總劑量, mg	Cmax*, ug/ml		CavgTau, ug/ml		Tau, h
		總計+	完整ADC ‡	總計+	完整ADC ‡	
3 mg/kg, iv, q3wx2	6	24.5	25.1	2.19	2.29	503
2.5 mg/kg, iv, q2wx3	7.5	21.2	21.6	2.59	2.30	335
1.5 mg/kg, iv, qwx6	9	11.0	11.0	2.56	2.50	167
0.72 mg/kg, iv, q3dx14	10	4.0	4.2	1.94	1.63	72

實例14：活體外及活體內評估ADCC活性

藉由與NK3.3細胞(殺傷細胞或效應細胞；San Louis University之Jacky Kornbluth友情提供)共培育，相對於Kato-III細胞(靶細胞；ATCC目錄#HTB-103)來測定非結合抗FGFR2抗體(12433、10164、12425、N297A_12425 (ADCC耗乏性變異體(Bolt等人, 2003 Eur J Immunol 23: 403-411)))介導抗體依賴細胞性細胞毒性(ADCC)的能力。簡言之，Kato-III細胞用鈣黃綠素乙醯氧基甲酯(鈣黃綠素-AM；Sigma-Aldrich目錄#17783-5MG)染色，洗滌兩次，以每孔5000個細胞之濃度吸移至96孔微量滴定盤(96孔，U型底，透明塑膠；Corning® Costar，目錄#650 160)中且與上述抗體及蛋白質(50,000至0.003 µg/ml)之連續稀釋液一起預培育10分鐘，隨後添加效應細胞。為了計算靶細胞之抗體特異性溶解作用，不含抗體或效應細胞之單獨靶細胞之並行培育充當基線及陰性對照，而陽性對照或最大溶胞或百分之百特異性溶解係藉由1% Triton-X™ 100溶液溶解單獨靶細胞來測定。靶細胞與效應細胞以1:5比率共培育之後，將微量滴定盤離心且將上清液之等分樣品轉移至另一微量滴定盤(96孔，平底，黑色，底部透明；Corning® Costar，目錄#3904)中且用螢光計數器(Victor™ 3多標

記計數器，Perkin Elmer)測定溶液中游離鈣黃綠素的濃度。結果呈現於圖11(A)中且觀測到所有測試抗體介導ADCC的程度不同。在抗體之Fc部分中不具有糖基化且從而不結合至效應細胞之CD16a受體的N297A_12425不介導任何ADCC且充當特異性陰性對照。靶細胞之恆定及蛋白質濃度非依賴性殺死係由於非特異性背景(針對Kato-III細胞之NK3.3細胞的天然殺死活性)。抗體12433介導最高約60%之靶細胞特異性溶解(信號推導出因NK3.3細胞所致之Kato-III細胞之背景溶胞)，而抗體12425及10164達到約55%之特異性溶解(信號推導出因NK3.3細胞所致之Kato-III細胞之背景溶胞)。所有三種分子的效能(各劑量反應曲線中之半最大殺死濃度；有效濃度50，EC₅₀)均類似。在一系列類似實驗中，對裸抗體12425誘導ADCC的能力與12425-MCC-DM1進行比較。未觀測到裸12425與12425-MCC-DM1之間存在差異，表明DM1結合減弱裸抗體誘導ADCC之能力不明顯。

在其他研究中，評估非結合抗FGFR2抗體結合補體因子C1q的能力。補體因子C1q之結合為初始步驟，活體內引起補體依賴性細胞毒性(CDC)及細胞溶解。在此等研究中，在4℃，在黑暗中，用抗體12433、12425、N297A_12425及10164之連續稀釋液(皆在25至0.02 µg/ml濃度範圍內)塗佈96孔微量滴定盤(Nunc®, Maxisorp®, 目錄#439454)之各孔表面隔夜。市購抗體利妥昔單抗充當陽性對照物。為了監測微量滴定盤上之所結合抗體分析物之量，此程序使用二次稀釋、每盤執行兩次(三重複)以便測定分析物對於盤之塗佈功效。藉由添加恆定濃度之C1q (Sigma；補體組分C1q目錄# C1740-1 mg)且使用多株山羊抗人類C1q抗體與辣根過氧化酶HRP (AbD Serotec；綿羊抗人類C1q:HRP；目錄號2221-5004P)之結合物偵測來對C1q結合進行定量。使用過氧化酶與山羊抗人類IgG抗體片段(Jackson ImmunoResearch；目錄#109-036-003；AffiniPure F(ab'2)片段山羊抗

人類IgG (H+L))之結合物測定二次連續稀釋液的對照塗佈效率。兩者均利用TMB受質(TMB過氧化酶EIA受質套組；Bio-Rad；目錄#172-1067)目測，隨後使用UV-Vis光譜儀(Molecular Devices；Spectramax®Pro 340)量測450 nm光學密度。結果呈現於圖11(B)中。結合至測試抗體之C1q蛋白的最大量對於所有分析物而言皆相同。結合至微量滴定盤之抗體量對於所有分析物而言皆相同，但其中10164抗體僅達到其他分子之約50%。12433、10164及利妥昔單抗之效能(各劑量反應曲線中之半最大結合濃度；有效濃度50， EC_{50})大致相同。12425抗體之 EC_{50} 為3倍高且N297A_12425之 EC_{50} 為約8倍高。鑒於10164塗佈微量滴定盤不如其他抗體同樣好的結果，因此對於C1q結合之觀測結果意味著10164結合至C1q蛋白的能力接近雙倍。

除評估C1q結合之外，亦評估非結合抗FGFR2抗體12433、10164、12425及N297A_12425引發補體依賴性細胞毒性(CDC)的能力。將Kato-III細胞(靶細胞；ATCC目錄號HTB-103)以每孔10000個細胞之濃度均等分配至96孔微量滴定盤(Costar；無菌，白色，96孔平底細胞培養盤，目錄#3610)之各孔中且與上述抗體之連續稀釋液一起預培育10分鐘，隨後添加效應試劑。此研究中所用的效應試劑為兔補體(PelFreez；目錄#31060-1)，將其吸移至Kato-III細胞上，最終稀釋度為1:6。在37°C、在增濕細胞培養恆溫箱中培育二小時之後，將微量滴定盤離心，丟棄上清液且將細胞離心塊溶於經復原之CellTiterGlo®(Promega；CellTiterGlo®發光套組，目錄#G7572)中。用多標記讀出器(Perkin Elmer；Victor™ 3)對發光進行定量。所有測試抗體之結果呈現於圖11(C)中。未觀測到測試抗體(圖11(C))或其他對照物(市購抗體Erbix®及Herceptin®，資料未顯示)存在CDC證據。

為了評估ADCC在12425-MCC-DM1活體內活性中的作用，將漢克氏平衡鹽溶液中含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)之懸

浮液中的 10×10^6 個細胞皮下植入雌性裸小鼠中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。研究中募集植入後七天平均腫瘤體積為201.4 mm^3 的小鼠。隨機分入五組之一($n=6/\text{組}$)之後，小鼠接受10 mg/kg靜脈內劑量之對照裸IgG、裸N297A_12425、裸12425、N297A_12425-MCC-DM1，或12425-MCC-DM1。腫瘤每週測徑兩次(圖 11(D))。ADCC耗乏之裸12425變異體(裸N297A_12425)在給藥後25天展現的抗腫瘤活性小於ADCC勝任型親本12425 (分別為61%及13% T/C)。此等資料表明，親本12425的效應細胞功能可在裸抗體活體內抗腫瘤活性之活性中起作用。ADCC勝任型12425-MCC-DM1及ADCC耗乏型N297A_12425-MCC-DM1在給藥後25天展現類似的抗腫瘤活性(分別為45%及32%消退率)。此等資料表明，雖然ADCC活性可擴增，但類美登素有效負荷均需要且足以得到12425-MCC-DM1的活體內強抗腫瘤活性。

實例15：對抗FGFR抗體及ADC調節過度表現FGFR4之細胞株中之信號傳導進行評估

評估非結合及結合之抗FGFR抗體調節過度表現FGFR4之細胞株中之FGFR信號傳導的能力。在初始研究中，測定10164 (FGFR2特異性)、12433 (FGFR2特異性)、12425 (FGFR2/4交叉反應性)及相關MCC-DM1結合物對MDA-MB453 (ATCC目錄#HTB-131)細胞的作用。簡言之，細胞於補充有10% FBS之RMPI中接種於CellBind™ 12孔盤(Costar，目錄#3336)中且在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO_2 下培育隔夜。實驗當天，吸出細胞培養基且用測試抗體或小分子FGFR抑制劑BGJ398置換，該等測試抗體或小分子FGFR抑制劑BGJ398皆在補充有10% FBS的RPMI中稀釋(抗體/ADC最終濃度為13-130 nM；BGJ398最終濃度為500 nM)。細胞接著在組織培養恆溫箱中、在37°C及5% CO_2 下培育2小時。此培育之後，細胞用冷PBS (Lonza，目錄

#17516C)洗滌兩次，置放於冰上且添加300 μ l溶胞緩衝液(Cell Signaling Technology，目錄#9803)，該溶胞緩衝液具有PhosphoSTOP (Roche，目錄#04 906237001)。藉由BCA分析(Pierce，目錄#23228)測定蛋白質濃度。藉由BCA分析(Pierce)測定蛋白質濃度。60 μ g蛋白質接著藉由SDS-PAGE解析，轉移至硝化纖維膜上且用針對pFRS2 (Cell Signaling Technology，目錄#3864)、總FGFR4 (R & D systems，目錄#8652)及 β -肌動蛋白(Bethyl，目錄#A300-485A)或細胞角蛋白(Dako，目錄#M3515)的抗體探測。結果呈現於圖12(A)中，且發現在2小時時，非結合或呈MCC-DM1 ADC形式的抗體皆不能調節pFRS2信號。使用12425抗體(4.3 nM)及12425-MCC-DM1 ADC (4.3 nM抗體，13 nM DM1等效物)進行進一步實驗，其中評估其他時間點(4小時、24小時及72小時)。結果呈現於圖12(B)中。亦利用RH4橫紋肌肉瘤細胞株獲得類似資料。

實例16：評估抗FGFR抗體及ADC對過度表現FGFR4之細胞株的抗增殖作用

利用類似於如上述實例9所用的方法評估非結合及結合SMCC-DM1之抗FGFR抗體抑制過度表現FGFR4之一組細胞株的能力。

根據其與FGFR4之交叉反應性，發現12425-MCC-DM1為MDA-MB453細胞生長之強抑制劑，MDA-MB453細胞過度表現FGFR4之組成性活性突變形式(Roidl等人，2010, Oncogene, 29, 1543-1552)。使用抗FGFR4抗體(Biolegend目錄#324306；圖13(A))、藉由FACS分析確認FGFR4表現。12425不僅對MDA-MB453，而且對過度表現FGFR4之其他細胞株(資料未顯示)顯示與Biolegend抗體類似的結合特性。此作用對ADC具有特異性，因為非結合之12425抗體無活性(圖13(A))。此外，投與FGFR2特異性抗體(10164)或ADC (10164-MCC-DM1)之後，未觀測到活性，表明FGFR4表現驅動此作用(圖13(A))。此與此等細胞

上缺乏可偵測FGFR2表現一致，如FAC所評估(資料未顯示)。亦觀測到12425-MCC-DM1及12425對過度表現FGFR4之橫紋肌肉瘤細胞株RH4 (圖13(B))及JR(圖13(C))的作用類似。當擴展至其他細胞株時，觀測到12425-MCC-DM1對過度表現FGFR4之乳房及橫紋肌肉瘤細胞株的活性(圖13(D))。

實例17：FGFR ADC及非結合抗體對過度表現FGFR4之腫瘤的活體內PK-PD

為了評估FGFR4陽性MDA-MB-453異種移植物模型中之PD調節，使用雌性NSG小鼠。細胞植入之前一天，將0.36 mg持續釋放90天之17 β -雌二醇丸粒(Innovative Research of America)皮下植入雌性NSG小鼠中。17 β -雌二醇丸粒植入後第一天，皮下注射含有5x10⁶個細胞之懸浮液，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。一旦腫瘤達到300 mm³至500 mm³ (n=3/組)，則六隻小鼠隨機分配以接受單一靜脈內15 mg/kg劑量之12425-MCC-DM1或對照IgG-MCC-DM1。給藥後96小時，相對於接受IgG-MCC-DM1的對照小鼠，12425-MCC-DM1使核pHH3陽性明顯增加(代表性影像顯示於圖14(A)中)。

為了評估FGFR4陽性MDA-MB-453異種移植物模型中之PD調節時程，使用雌性NSG小鼠。細胞植入之前一天，將0.36 mg持續釋放90天之17 β -雌二醇丸粒(Innovative Research of America)皮下植入雌性NSG小鼠中。17 β -雌二醇丸粒植入後第一天，皮下注射含有5x10⁶個細胞之懸浮液，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。小鼠隨機分配以接受單一靜脈內15 mg/kg劑量之12425-MCC-DM1 (治療投藥後24、48、72、96及168小時每組收集三隻小鼠)

或PBS (10 ml/kg)。隨機分組時，腫瘤體積範圍為300 mm³至500 mm³。與類美登素有效負荷之預期作用機制一致，12425-MCC-DM1使核pHH3陽性產生明顯的時間依賴性增加(相對於PBS處理之對照組)，在給藥後約72-96小時達到峰值。所分裂卡斯蛋白酶3的免疫反應性在給藥後約96小時及168小時達到峰值。代表性影像顯示於圖14(B)中。

一部分腺泡型橫紋肌肉瘤(包括RH4細胞株)含有Pax 3/7-FOXO1A易位，其使得FGFR4 mRNA及蛋白質表現提高。為了評估RH4異種移植模型中的PD調節，將10x10⁶個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠，該懸浮液含有50%無苯酚紅基質膠(BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 µl。一旦腫瘤達到500 mm³至700 mm³ (n=3/組)，則六隻小鼠隨機分配以接受單一靜脈內15 mg/kg劑量之12425-MCC-DM1、對照IgG-MCC-DM1或PBS (10 ml/kg)。給藥後96小時，相對於接受IgG-MCC-DM1的對照小鼠，12425-MCC-DM1使核pHH3陽性明顯增加(代表性影像顯示於圖14(C)中)。此等發現證明，12425-MCC-DM1在此FGFR4陽性異種移植模型中引起G2/M細胞週期停滯。

實例18：抗FGFR ADC在過度表現FGFR4之腫瘤中的活體內功效

評估12425-MCC-DM1在FGFR4陽性MDA-MB-453乳癌異種移植模型中的劑量反應抗腫瘤活性。細胞植入之前一天，將0.36 mg持續釋放90天之17β-雌二醇丸粒(Innovative Research of America)皮下植入雌性NSG小鼠中。17β-雌二醇丸粒植入後第一天，皮下注射含有5x10⁶個細胞之懸浮液，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigelTM (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 µl。研究中募集植入後12天平均腫瘤體積為197.9 mm³的小鼠。隨機分入五組之一(n=5/組)之後，向小鼠靜脈內投與PBS (10

ml/kg)、對照IgG-MCC-DM1 (15 mg/kg)、非結合12425 IgG (15 mg/kg)、或12425-MCC-DM1 (5 mg/kg、10 mg/kg或15 mg/kg) (圖15(A))。對照IgG-MCC-DM1在此模型中無活性。給藥後29天, 單一劑量之15 mg/kg裸IgG 12425或5 mg/kg 12425-MCC-DM1展現類似活性(分別為25%及24% T/C)。以10 mg/kg與15 mg/kg投與的12425-MCC-DM1使得腫瘤消退(分別為72%及92%消退率)。

評估12425-MCC-DM1在FGFR4陽性、Pax 3/7-FOXO1A陽性RH4異種移植物模型中的劑量反應抗腫瘤活性。將 10×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠中, 該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。研究中募集植入後11天平均腫瘤體積為200.8 mm³的小鼠(圖15(B))。隨機分入五組之一(n=8/組)之後, 向小鼠靜脈內投與PBS (10 ml/kg)、對照IgG-MCC-DM1 (15 mg/kg)、非結合12425 IgG (15 mg/kg)、或12425-MCC-DM1 (5 mg/kg、10 mg/kg或15 mg/kg)。對照IgG-MCC-DM1在此模型中無活性。類似地, 單一15 mg/kg劑量之裸IgG 12425展現有限活性。12425-MCC-DM1在5 mg/kg、10 mg/kg及15 mg/kg之單一劑量下展現抗腫瘤活性(分別為36%、24%、26% T/C)。此等發現證明, Pax 3/7-FOXO1A易位引起足以使RH4細胞株對12425-MCC-DM1敏感的FGFR4表現。因此, 12425-MCC-DM1可用於治療患有Pax 3/7-FOXO1A易位陽性橫紋肌肉瘤的患者。

實例19：評估抗FGFR ADC在小鼠、大鼠及食蟹猴中的藥物動力學

評估1-15 mg/kg範圍內之若干劑量的抗FGFR ADC在具有腫瘤及不具有腫瘤之小鼠中、1 mg/kg、5 mg/kg及45 mg/kg之抗FGFR ADC在不具有腫瘤之大鼠中及30 mg/kg之抗FGFR ADC在食蟹猴中的藥物動力學(PK)。在所有研究中, 使用經驗證的ELISA方法量測「總」抗體與「抗體藥物結合物(ADC)」在所有動物物種中的血清濃度。

「總」分數係指與DM1結合或不結合之抗體的量測值，而ADC分數僅指DM1與抗體結合物的量測值(≥ 1 個DM1分子)。在所有研究中，ADC之清除率與總抗體分數之間未觀測到明顯的差異。

單一IV劑量之3 mg/kg之後，研究具有SNU16腫瘤之小鼠中的12425-MCC-DM1 PK。給藥後1小時、24小時、72小時、168小時及336小時收集PK樣品且此劑量下之血清濃度之總分數及ADC分數可疊加(圖16(A))。在SNU16異種移植植物存在下，12425-MCC-DM1半衰期為約1.5天。

單一IV劑量之1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg或15 mg/kg之後，亦研究不具有腫瘤之小鼠中的12425-MCC-DM1 PK。給藥後1小時、6小時、24小時、72小時、96小時、168小時、240小時、336小時及540小時收集PK樣品。血清濃度之總分數及ADC分數在此等劑量下可疊加(圖16(B))且不具有腫瘤之動物與具有腫瘤之動物呈現類似的PK特性。

亦測定12433-MCC-DM1及10164-MCC-DM1在具有SNU16腫瘤之小鼠中的PK。此等ADC之整體PK概況類似於12425-MCC-DM1且所得資料總結於表17中。

表17：3 mg/kg劑量之12433-MCC-DM1、12425-MCC-DM1及10164-MCC-DM1在小鼠中的藥物動力學特性

Ab	Cmax (ug/mL)		CL (mL/h/kg)		V(mL/kg)		t1/2 (h)	
	TOTAL	ADC	TOTAL	ADC	TOTAL	ADC	TOTAL	ADC
12425-MCC-DM1	45.0	50.4	1.85	1.72	97.0	89.5	36.4	36.1
12433-MCC-DM1	52.4	42.7	1.61	1.95	101.0	122.9	43.5	43.8
10164-MCC-DM1	42.8	37.5	1.18	1.28	101.4	117.5	59.4	64.0

在兩種劑量(IV投與1 mg/kg及5 mg/kg)下研究不具有腫瘤之大鼠

中的12425-MCC-DM1 PK。在0.5、1、2、6、8小時及在第1、2、4、8、11、14、21及35天收集PK樣品。在兩種劑量下，「總」與「ADC」物種之濃度時間概況幾乎可疊加(圖16(C))。在1 mg/kg劑量組中，終末排除期為輕微陡峭的，且此可為目標介導藥物處置(TMD)在隨後時間點的結果。類似地，對於總分數及ADC分數而言，在1 mg/kg劑量下，清除值分別為 0.757 ± 0.088 mL/h/kg及 0.813 ± 0.041 mL/h/kg，而在5 mg/kg劑量下，分別注意到稍微較低值 0.623 ± 0.027 mL/h/kg及 0.607 ± 0.019 mL/h/kg。12425-MCC-DM1 ADC物種在5 mg/kg劑量下具有約3.9天之終末半衰期。在其他研究中，亦在5 mg/kg及45 mg/kg劑量下測定大鼠PK。5 mg/kg劑量下之半衰期類似於上述值，而對於總分數及ADC分數而言，45 mg/kg劑量下之半衰期分別為163.9小時、121.3小時(約5天)，且此等值類似於非FGFR2/4交叉反應性對照ADC的觀測結果，表明任何可能的TMD清除途徑已飽和。

在類似研究中亦測定12433-MCC-DM1及10164-MCC-DM1 PK且所得PK參數呈現於表18中。發現在所用劑量下，所有3種測試ADC的總半衰期及ADC半衰期及清除率估算值類似。

表 18：12433-MCC-DM1、12425-MCC-DM1及10164-MCC-DM1在大鼠中的藥物動力學特性

劑量(mg/kg)	Ab	t _{1/2} (h)		AUC _{inf} (ug.h/mL)		CL (mL/h/kg)	
		總濃度	ADC	總濃度	ADC	總濃度	ADC
5	12433-MCC-DM1	71.1	59.0	388.8	374.0	0.536	0.557
45	12433-MCC-DM1	176.7	131.9	4399.3	3929.8	0.426	0.477
5	12425-MCC-DM1	77.0	64.0	12853	12874	0.389	0.388
45	12425-MCC-DM1	163.9	121.3	103265	103647	0.436	0.434
5	10164-MCC-DM1	88.0	78.0	12677	14644	0.394	0.341
45	10164-MCC-DM1	140.1	110.3	139842	150433	0.322	0.299

向一組三隻食蟹猴(1隻雄性，2隻雌性)投與單一30 mg/kg IV劑量之後，研究12425-MCC-DM1 PK。在第1天0時(給藥之前)，及在給藥後0.25小時、2小時、4小時、6小時、24小時、48小時、72小時、168小時及240小時時收集血清樣品。IV注射之後立即(亦即在0.25小時，首次取樣時間點)觀測到12425-MCC-DM1最大暴露量。時程的特徵為較長排除期，且在取樣時程期間的總分數及ADC分數概況可疊加(圖16(D))。終末半衰期為約6-7天。

向一組三隻食蟹猴投與單一30 mg/kg IV劑量之後，亦研究10164-MCC-DM1 PK。此試劑之時程的特徵亦為較長排除期(終末半衰期為6-7天)且10164-MCC-DM1與12425-MCC-DM1之PK參數均呈現於表19中。

表19. 30 mg/kg IV劑量之後，12425-MCC-DM1與10164-MCC-DM1在食蟹猴中的藥物動力學特性

測試物	C _{max} (µg/mL)	AUC _{0-240h} (µg.h/mL)	AUC _{0-inf} (µg.h/mL)	CL (mL/h/kg)	t _{1/2} (h)
12425 總濃度	785.6 ± 72.2	64612 ± 6477	99979 ± 12060	0.303 ± 0.038	166.5 ± 36.4
ADC	780.6 ± 84.2	66656 ± 7577	99113 ± 16895	0.310 ± 0.052	151 ± 22.3
10164 總濃度	1032 ± 423	79535 ± 6506	124946 ± 11687	0.242 ± 0.0237	175.1 ± 44.1
ADC	909.5 ± 224.3	81150 ± 4658	122061 ± 8615	0.247 ± 0.018	158.1 ± 33

實例20：評估序列修飾型抗FGFR抗體與ADC活體外及活體內活性

已認識到治療性抗體之序列中可存在潛在結構性傾向，此等傾向可影響最終蛋白質之異質性且可影響例如抗體可製造性及免疫原性。此等傾向可包括糖基化位點、不成對半胱胺酸、潛在脫醯胺位點等。為了降低此等潛在傾向之風險，可引入突變以移除一或多種此等傾向。舉例而言，潛在脫醯胺位點可單獨或連同其他結構變化一起置換。潛在脫醯胺位點之實例包括10164及12425之重鏈CDR2中之DG(參見表1)。此等殘基可突變為其他適當胺基酸。作為非限制性實

例，10164 HCDR2中之天冬胺酸(D)可突變為麩胺酸(E)或蘇胺酸(T)。在12425中，HCDR2甘胺酸(G)可突變為另一胺基酸，諸如丙胺酸(A)。

亦應瞭解，在抗體在胺基酸層面與其各別生殖系序列不同的情況下，抗體可回復突變為其生殖系序列。此等修正性突變可在一或多個位置發生且使用標準分子生物學技術或藉由基因合成來產生。作為非限制性實例，12425重鏈之重鏈序列(SEQ ID NO: 9，參見表1)不同於對應生殖系序列之處為位置1之E突變為Q，且輕鏈(SEQ ID NO: 17)不同於對應生殖系之處為位置85之V突變為T。因此，12425中之胺基酸可在任何或所有此等位點修飾。

用於產生本申請案中所述之抗體藥物結合物的化學方法依賴於與抗體序列中之離胺酸(K)殘基結合。在此等離胺酸殘基存在於涉及抗原決定基識別之區域(例如CDR區)中的情況下，在此等位點處發生顯著結合，可改變抗體藥物結合物結合至其預定目標的能力。為緩和此潛在風險，此等離胺酸殘基可突變為適當的替代胺基酸，諸如精胺酸、天冬醯胺酸或麩醯胺酸。12425之重鏈CDR2與CDR3區域中均存在一個離胺酸。此等離胺酸中之一或多者可突變為替代殘基，諸如精胺酸、天冬醯胺酸或麩醯胺酸。

將若干個上述變化引入12425抗體中以產生抗體20562 (表1)。比較此抗體與12425結合至FGFR2的能力、抑制FGFR2擴增性細胞株(諸如SNU16)增殖的能力及活體內產生針對SNU16細胞之抗腫瘤作用的能力。發現20562對人類FGFR2 IIIb及FGFR4的親和力在類似分析條件下類似於12425 (20562 FGFR2 IIIb親和力估算值：9 nM；人類FGFR4親和力估算值：3.3 nM)。藉由使用實例6中的方法，類似於12425-MCC-DM1，20562-MCC-DM1亦為活體外SNU16細胞增殖之強抑制劑(圖17(A))。為了評估20437-MCC-DM1之活體內效能，將漢克

氏平衡鹽溶液中含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)之懸浮液中的 10×10^6 個細胞皮下植入雌性裸小鼠中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。研究中募集植入後七天平均腫瘤體積為217.1 mm^3 的小鼠。隨機分入五組之一($n=6/\text{組}$)之後，小鼠接受PBS (10 ml/kg)或3 mg/kg i.v.劑量之12425-MCC-DM1或20562-MCC-DM1。腫瘤每週測徑兩次(圖17(B))。12425-MCC-DM1與其變異體20562-MCC-DM1均具有活體內針對FGFR2擴增性SNU16異種移植物的類似活性。此等資料表明可移除親本抗體之DG位點而不影響ADC之活體內活性。

實例21：產生及表徵親和力成熟型FGFR ADC

為了評估親和力對所選抗FGFR抗體之生物活性的影響，對12433、10164及12425純系進行親和力最佳化。在此等研究中，L-CDR3及H-CDR2區域藉由卡匣突變誘發、使用三核苷酸導引突變誘發(Virnekas等人, 1994 Nucleic Acids Research 22: 5600-5607)進行並行最佳化，同時保持構架區不變。在選殖以便進行親和力成熟之前，將親本Fab片段經由XbaI/EcoRI自相應表現載體pM[®]x11轉移至CysDisplay™載體pMORPH[®]30中。

對親本Fab片段之L-CDR3進行最佳化時，移除結合劑之L-CDR3且用多樣化L-CDR3之系譜置換。對於各親本Fab而言，已產生具有多樣化H-CDR2的第二文庫集。對於各成熟文庫(LCDR3及HCDR2)，製備抗體呈現噬菌體且藉由點滴滴定測定噬菌體效價。文庫擴增係如別處所述執行(Rauchenberger等人, 2003 J Biol Chem 278: 38194-38205)。對於品質控制而言，隨機選取單一純系且測序。

選擇親和力提高之結合劑時，使用生物素化人類FGFR2對來源於成熟文庫的噬菌體進行三輪溶液淘選。藉由在各輪淘選時降低抗原濃度來增強嚴格度(Low等人, 1996 J Mol Biol 260(3): 359-368)。除抗原降低之外，選擇解離速率(Hawkins等人, 1992 J Mol Biol 226: 889-

896)。將此舉與室溫下之洗滌步驟延長組合。一般淘選程序如上所述執行(溶液淘選)。

對於所選子碼而言，所進行之H-CDR2親和力成熟淘選之第二輪淘選輸出結果另外在L-CDR3中多樣化。文庫產生恰好如上文所述進行。選擇改良之結合劑時，對新產生的文庫進行另外兩輪溶液淘選。

所鑑別之序列獨特純系係以IgG表現且對人類FGFR2的親和力係使用SET或Biacore®方法(類似於實例1及2中所述方法)測定。評估來自3種親本抗體的超過80個純系且來源於12433抗體之純系獲得3-6倍之親和力改良、10164源純系獲得27倍親和力改良且12425源抗體獲得68倍親和力改良。來源於10164的最高親和力純系指名為20809且其對人類FGFR2的親和力經測定為450 pM。有趣的是，此抗體亦以7.4 nM之親和力估算值結合至人類FGFR4。來源於12425的最高親和力抗體指名為20811 (表1)且其對人類FGFR2的親和力經測定為110 pM。此抗體對FGFR4的親和力經測定為75 pM。

在其他研究中，20809與20811與SMCC-DM1直接結合而產生20809-MCC-DM1及20811-MCC-DM1。此等ADC抑制SNU16細胞生長的能力顯示於圖18(A)中。評估親和力對FGFR2擴增性SNU16異種移植模型之活體內抗腫瘤活性的影響。將 10×10^6 個細胞於懸浮液中皮下植入雌性裸小鼠中，該懸浮液含有50%無苯酚紅matrigel™ (BD Biosciences)於漢克氏平衡鹽溶液中。含有細胞之懸浮液的總注射體積為200 μ l。研究中募集植入後七天平均腫瘤體積為217.6 mm³的小鼠。隨機分入五組之一(n=6/組)之後，小鼠接受PBS (10 ml/kg)或3 mg/kg i.v.劑量之12425-MCC-DM1、20811-MCC-DM1、10164-MCC-DM1或20809-MCC-DM1。腫瘤每週測徑兩次(圖18(B))。10164-MCC-DM1及其親和力成熟變異體20809-MCC-DM1顯示針對SNU16異種移植物的類似活性。就抗腫瘤活性而言，12425-MCC-DM1優於其親和

力成熟變異體20811-MCC-DM1。此等資料表明親和力成熟未產生如MCC-DM1 ADC之活體內活性改良。

實例22：藉由氘交換質譜測定法(HDx-MS)對FGFR2及其抗體複合物進行抗原決定基定位

氘交換質譜測定法(HDx-MS)係量測蛋白質之醯胺骨架上之氘吸收。此等量測對醯胺溶劑可接近性及骨架醯胺之氫鍵網路的變化敏感。HDx-MS通常用於比較兩種不同狀態下之蛋白質，諸如細胞凋亡及配位體結合狀態，及經胃蛋白酶快速消化而偶合的狀態。在此等實驗中，可定位出典型為10至15個胺基酸之區域，此等區域顯示兩種不同狀態之間的氘吸收差異。經保護的區域直接涉及配位體結合或受到配位體結合的別位影響。

在此等實驗中，在三種治療性抗體：12425、10164及12433的不存在及存在下量測大腸桿菌源FGFR2 D2-D3蛋白(SEQ ID NO: 135，參見下文)之氘吸收。抗體結合時顯示氘吸收降低的FGFR2區域可能涉及抗原決定基；然而，由於量測之性質，因此亦可偵測遠離直接結合位點的變化(別位影響)。通常，保護量最大的區域涉及直接結合，但情況可能不始終如此。為了描繪別位影響所致的直接結合事件，需要正交量測(例如X射線結晶學、丙胺酸突變誘發)。

表20. FGFR2 D2-D3構築體

SEQ ID NO: 135 長度：237個胺基酸 類型：蛋白質 生物體：人類
MAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPTMRWLK NGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVV ERSPHRPILQAGLPANASTVVG DVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGP DGL PYLKV LKHSGINSSNAEVLALFNVTEADAGEYICKVS NYIGQANQSAWLT VLPKQQA PGREKEHHHHHH

此實例中所述的抗原決定基定位實驗係在Waters HDx-MS平台上進行，該平台包括LEAP自動取樣器、nanoACQUITY UPLC系統及

Synapt G2質譜儀。研究藉由LEAP自動取樣器自動操作，LEAP自動取樣器藉由LeapShell軟體操作，其執行氘交換反應之起始、反應時間控制、淬滅反應、注射至UPLC系統上及消化時間控制。Leap自動取樣器裝備有兩個分別維持在25℃用於HDx反應及維持在2℃用於儲存蛋白質及淬滅溶液的溫度控制堆疊。以25分鐘之氘交換時間對抗原進行三重複對照實驗。用淬滅緩衝液(6 M尿素及1 M TCEP, pH = 2.5)淬滅HDX。淬滅之後，將抗原注入UPLC系統中，在UPLC系統中、在12℃下對其進行線上胃蛋白酶消化，隨後在Waters BEH C18 1x100 mm管柱(維持在1℃)上、以40 μ L/min之流速、以2%至35%乙腈梯度進行8分鐘快速溶離。對抗原-mAb複合物進行三重複實驗，恰如對照實驗，但在此等實驗中，在氘交換之前，使抗原與抗體一起在25℃培育30分鐘。

此等量測之結果總結於圖19(A)及圖19(B)中。圖19(A)中顯示在mAb不存在(對照)及存在下之FGFR2肽的平均氘吸收。在此圖中，檢查兩種差異為有用的：對照物與mAb之間的差異，及mAb群組之間的差異。在圖19(B)中，mAb與對照樣品之間的氘吸收差異除以量測之標準誤差。若差異的絕對標度大於0.5 Da (圖19(A))及若差異除以標準誤差之比率小於或等於-3.0 (圖19(B))，則差異視為顯著。根據此分析，可將mAb結合時受保護之FGFR2區域分類為以下等級：高量保護、中量保護及低量保護。高保護之FGFR2區域潛在地涉及形成特異性抗體之抗原決定基，但不能排除較小保護區域的其他影響。

10164結合至FGFR2時，在FGFR2之以下兩個區域中觀測到高量保護：SEQ ID NO: 137之殘基174-189及198-216。此等區域位於D2域中，D2域特定地由 β B至N末端一側之 β C及 β C'至 β E環組成(圖19(C)及(D))。發現在區域222-231中存在一個低保護區域。然而，此區域在所有研究抗體結合時受保護；此觀測結果表明，此區域經歷其局部氫鍵

網路之穩定化，此穩定化可具非特異性及別位性質。抗體12425結合至FGFR2亦在SEQ ID NO: 137之殘基174-189及198-216區域中引起高量保護。另外，對於12425家族而言，亦觀測到SEQ ID NO: 137之殘基160-173區域中存在高量保護(圖19(A)及(B))。根據公開的結晶學資料，此等區域包含已知可與FGF2及FGF1相互作用的FGFR2區域(Plotnikov等人, *M. Cell* 2000, 101, 413-424；Beenken等人, *M. J. Biol. Chem.* 2012, 287, 3067-3078)。此區域中存在之保護現象為12425抗體家族所獨有。在所研究抗體中，12433獨特之處在於其經由與FGFR2之D3域的相互作用特異性靶向FGFR2之IIIb同功異型物。對於12433而言，觀測到肽338-354中存在高量保護(約2 Da)，且在較短的N末端片段338-345中觀測到不顯著量的保護。此觀測結果表明，在12433結合時受保護的338-354肽部分為區域346-354 (圖19(A)及(B))。區域346至354含有相對於IIIc同功異型物而對IIIb同功異型物具有特異性的四個殘基；此等殘基包括：Q348、A349、N350及Q351。在其他研究中，評估10164及12425之親和力成熟形式(參見下文實例23)且就所觀測到之受保護區域而言，發現類似於其各別親本抗體。

另外，使用類似方法進行氘交換研究，在FGFR2/4交叉反應性抗體12425存在下檢查FGFR4中之保護現象。使用FGFR4 D1-D3構築體(SEQ ID NO: 124，參見下文)的初步分析表明，12425之結合未在D3區域中引起任何保護現象。保護似乎限於D1及D2域內之區域。

表21. FGFR4 D1-D3構築體

SEQ ID NO: 124
長度：371個胺基酸
類型：蛋白質
生物體：人類
LEASEVELEPCLAPSLEQQEQELTVALGQPVRLCCGRAERGHHWYKEGSRLAPAGR VRGWRGRLEIASFLPEDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSLTSNDDDEDPKSHRDP SNRHSYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLKDGQAFH GENRIGGIRLRHQHWSLVMESVVPSPDRGTYTCLVENAVGSIIRYNYLLDVLERSPHRPI LQAGLPANTTAVVGSDVELLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKT

ADINSSEVEVLYLRNVSAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPTWTAAPEA RYTDKLEFRHDSGLNDIFEAQKIEWHE
--

實例23：對人類FGFR2/12425 Fab及FGFR4/12425 Fab複合物進行X射線晶體結構測定

測定結合至12425之Fab片段(表22)之人類FGFR2 ECD片段(FGFR2域2，或FGFR2 D2，SEQ ID NO: 138，表22)或人類FGFR4 ECD片段(FGFR4域2，或FGFR4 D2，SEQ ID NO: 143，表22)的晶體結構。如下文詳述，表現、純化FGFR2 D2或FGFR4 D2，且與12425 Fab混合而形成複合物。接著利用蛋白質結晶學產生結合至12425 Fab之FGFR2 D2或FGFR4 D2的原子解析資料，以界定抗原決定基。藉由使關鍵抗原決定基殘基發生突變且利用表面電漿共振(SPR)技術量測突變體FGFR2與12425之結合來進一步驗證FGFR2之結晶學抗原決定基。

根據結晶學及SPR產生蛋白質

根據結晶學及SPR產生之蛋白質序列顯示於表22中。FGFR2 D2構築體包含人類FGFR2 (UniProt標識符P21802-3，SEQ ID NO: 137)之殘基146至249 (加下劃線)以及來自重組表現載體之N末端殘基及C末端殘基(小寫字母顯示，SEQ ID NO: 137)。FGFR4 D2構築體(SEQ ID NO: 143)包含人類FGFR4 (UniProt標識符P22455-1，SEQ ID NO: 142)之殘基140至242 (加下劃線)，以及來自重組表現載體之N末端殘基及C末端殘基(小寫字母顯示)。FGFR2域2至域3構築體(D2D3)包含殘基140至369 (SEQ ID NO 137中之斜體字母)。FGFR2 D2D3之野生型(WT)與K176A/R201A雙重突變形式係藉由SPR、根據抗原決定基驗證來產生(分別為SEQ ID NO: 144及145；小寫字母為來自重組表現載體的N末端殘基及C末端殘基)。對於12425 Fab而言，顯示重鏈與輕鏈之序列(分別為SEQ ID NO: 139及140)。

表22：結晶學及SPR所用之蛋白質序列

構築體	單字母碼形式之胺基酸序列	SEQ ID NO
人類 FGFR2 (P21802-3)	MVSWGRFICLVVVTMATLSLARPSFSLVEDTTLEPEEPPTK YQISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGP NNRTVLIGEYLQIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMV NVTDAISSGDDEDDTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKM EKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMTMRWLKNGKEFKQE HRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSIN HTYHLDVV ERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSD AQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLKHSGINSSNAEVLA LFNVTEADAGEYICKVSNIYGQANQSAWLTVLPKQQAPGREKE ITASPDYLEIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTTKKPDFSS QPAVHKLTKRIPLRRQVTVSAESSSSMNSNTPLVRITRLSST ADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGCFGQ VVM AEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSE MEMMKMIGKHKNINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLRE YLRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGM EYLASQKCIHRDLAARNVLVTENNVMKIADFGGLARDINNI DYYKKTNGRLPVKWM APEALFDRVYTHQSDVWSFGVL MWEFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTNELY MMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRILTTLTNEEYLDLS QPLEQYSPSPDTRSSCSSGDDSVFSPDPMPEPCLPQYPHI NGSVKT	137
FGFR2 D2	mNSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGN PMPTMRWLKNGKEFKQEHRIIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVlvprgslehhhhh	138
12425 Fab重鏈	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQA PGKGLEWVSVIEGDGSYTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREKTYSSAFDYWGQGT LTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH	139
12425 Fab輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSDLN WYQQKPG KAPKLLIYDASN LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA VYYCQQHYSPSHTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	140
人類 FGFR4 (P22455-1)	MRLLLALLGVLLSVPGPPVLSLEASEEVELEPCLAPSLEQQ EQELTVALGQPVR LCCGRAERGGHWYKEGSRLAPAGRVR GWRGRLEIASFLPEDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSL TSSNDDEDPKSHRDP SNRHSYPQQAPYWTHPQRMEKKL HAVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLKDQAFHGENRI GGIRLRHQHWSLVMESVVP SDRGTYTCLVENAVGSIRY NYLLDV LERSPHRPILQAGLPANTTAVVGSDVELLCKVYSD AQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKTADINSSEVEV LYLRNVSAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPT WTAAAP EARYTDIILYASGSLALAVLLLLAGLYRGQALHGR HPRPPATVQKLSRFPLARQFSLES GSSGKSSSSLVRGVRLSS SGPALLAGLVSLDPLDPLWEFPRDRLVLGKPLGEGCFGQV	142

	VRAEAFGMDPARPDQASTVAVKMLKDNASDKDLADLVSE MEVMKLIGRHKNIINLLGVCTQEGPLYVIVECAAKGNLREF LRARRPPGPDLSPDGPRSSEGPLSFPVLVSCAYQVARGMQY LESRKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARGVHHIDY YKKTSTNGRLPVKWMapeALFDRVYTHQSDVWSFGILLWEI FTLGGSPYPGIPVEELFSLREGHRMDRPPHCPPELYGLMR ECWHAAPSQRPTFKQLVEALDKVLLAVSEEYLDLRLTFGP YSPSGGDASSTCSSSDSVFSDHPLPLGSSSFPGSGVQT	
FGFR4 D2	mHSYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGN PTPTIRWLKDGQAFHGENRIGGIRLRHQHWSLVMESVVP DRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDVllvprgslehhhhh	143
FGFR2 D2D3	mAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKF RCPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRRIGGYKVRNQHWS LIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERS PHR PILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVE KNGSKYGPDGLPYLKVLKHSGINSSNAEVLALFNVT EADA GEYICKVSNIYGQANQSAWLTVPKQQAPGREKE Ehhhhhh	144
FGFR2 D2D3 K176A/R210A	mAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVAF RCPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRRIGGYKVANQHWS LIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERS PHR PILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVE KNGSKYGPDGLPYLKVLKHSGINSSNAEVLALFNVT EADA GEYICKVSNIYGQANQSAWLTVPKQQAPGREKE Ehhhhhh	145

FGFR2 D2 表現於大腸桿菌 BL21 (DE3) (Novagen^R, EMD Millipore)中。在18°C用IPTG誘導隔夜之後，收穫細胞，在-80°C冷凍且溶胞。包含體用20 mM磷酸鈉(pH 7.5)、300 mM NaCl及8 M尿素萃取，且裝載於經相同緩衝液預平衡的Ni-NTA管柱上。管柱用20 mM磷酸鈉(pH 7.5)、300 mM NaCl、50 mM硫酸銨及20 mM咪唑洗滌，隨後用20 mM磷酸鈉(pH 7.5)、300 mM NaCl、50 mM硫酸銨及300 mM咪唑溶離。所溶離蛋白質接著用20 mM磷酸鈉(pH 6.5) (緩衝液A) 12倍稀釋，且裝載於在緩衝液A + 2%之20 mM磷酸鈉(pH 6.5)、1.5 M NaCl、50 mM硫酸銨(緩衝液B)中預平衡的HiTrap S HP管柱(GE Healthcare)上。藉由緩衝液A + 2%-100%緩衝液B之梯度來溶離S管柱。將含有FGFR2 D2的主峰收集，濃縮且裝載於在20 mM Hepes pH 7.5、150 mM NaCl中平衡的HiLoad® 16/60 SuperdexTM 75 (GE Healthcare)上。藉由SDS-PAGE及LCMS分析峰溶離份且接著與12425 Fab混合而形成複合物。

FGFR4 D2表現於大腸桿菌菌株 Shuffle® T7 Express (New England BioLabs^R)中。在18°C用IPTG誘導隔夜之後，收穫細胞且溶解於50 mM磷酸鈉pH 7.5、300 mM NaCl + 0.1 mg/ml牛胰臟脫氧核糖核酸酶I (Sigma®)及1錠cOmplete蛋白酶抑制劑混合物錠劑(Roche®)/50 ml溶胞緩衝液中。藉由15,000 rpm離心1小時來使溶胞液澄清；接著向上清液中添加Talon^R樹脂(Clontech®)用於在4°C分批結合隔夜。次日，將樹脂裝填於管柱中，用50 mM磷酸鈉pH 7.5、300 mM NaCl、20 mM咪唑洗滌，且用50 mM磷酸鈉pH 7.5、300 mM NaCl、300 mM咪唑溶離。所溶離蛋白質接著用50 mM磷酸鈉pH 7.5 (緩衝液C) 12倍稀釋，且裝載於在緩衝液C + 2%之50 mM磷酸鈉pH 7.5、1 M NaCl (緩衝液D)中預平衡的HiTrap S HP管柱(GE Healthcare)上。藉由緩衝液C + 2%-100%緩衝液D之梯度來溶離S管柱。將含有FGFR4 D2的主峰收集，濃縮且裝載於在20 mM Hepes pH 7.5、150 mM NaCl中平衡的HiLoad® 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare)上。藉由SDS-PAGE及LCMS分析峰溶離份，接著與12425 Fab混合而形成複合物。

藉由所固著木瓜酶(Pierce)使全長12425 IgG分裂來產生12425 Fab。將含有20 mg/ml 12425 IgG之20 mM磷酸鈉pH 7.0及10 mM EDTA與所固著木瓜酶以80:1重量比混合。使混合物在15 ml管中、在37°C旋轉隔夜。次日，藉由重力流管柱移除所固著木瓜酶；收集含有Fab與Fc區段的流過液且裝載於HiTrap™ MabSelect SURE™管柱(GE Healthcare)上以移除Fc區段。將此步驟所得之流過液(僅含有Fab片段)濃縮且裝載於在20 mM Hepes pH 7.5、150 mM NaCl中平衡的HiLoad® 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare)上。藉由SDS-PAGE及LCMS分析峰溶離份，且接著與FGFR2 D2或FGFR4 D2混合而形成複合物。

FGFR2 D2/12425及FGFR4 D2/12425 Fab複合物之結晶及結構測定

FGFR2 D2或FGFR4 D2與12425 Fab之複合物如下製備：將純化FGFR2 D2或FGFR4 D2與12425 Fab以2:1莫耳比(濃度經由LCUV量測)混合，在冰上培育30分鐘，且在20 mM Hepes pH 7.5、150 mM NaCl平衡之HiLoad® 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare)中純化複合物。藉由SDS-PAGE及LCMS分析峰溶離份。

為使FGFR2 D2/12425 Fab複合物結晶，將含有複合物之溶離份混合且濃縮至約30 mg/ml。將胰蛋白酶(以1 mg/ml溶於1 mM HCl及2 mM CaCl₂中)以1:100之體積比添加至複合物中以促進結晶(Wernimont等人, (2009) Plos One 4:e5095)。FGFR2 D2/12425 Fab/胰蛋白酶混合物立即離心且篩選用於結晶。

晶體藉由沈滴氣相擴散法生長。詳言之，將0.1 µl蛋白質與0.1 µl含有0.1 M二水合檸檬酸三鈉pH 5.0、20% (w/v) PEG6000的儲備溶液混合；且滴劑在4°C相對於45 µl相同儲集溶液平衡。

為使FGFR4 D2/12425 Fab複合物結晶，將含有複合物的尺寸排除溶離份混合，濃縮至20 mg/ml，離心且篩選用於結晶。晶體係以與FGFR2 D2/12425 Fab複合物(上述)相同的方式生長，但其中儲備溶液含有0.2 M甲酸鎂、20% (w/v) PEG3350且晶體係在20°C生長。

資料收集之前，將FGFR2 D2/12425 Fab及FGFR4 D2/12425 Fab晶體轉移至另外含有22.5%甘油的儲備溶液中且在液氮中急驟冷卻。在Advanced光子源(Argonne National Laboratory, USA)之光束線17-ID收集繞射資料。處理資料且使用HKL2000 (HKL Research)在2.8Å放大。使用Phaser (McCoy等人, (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674)、以FGFR2 D2結構(PDB ID: 3DAR)及內部Fab結構作為搜尋模型、藉由分子置換法來求得兩種結構。以COOT (Emsley及Cowtan (2004) Acta Cryst. 60:2126-2132)建立最終模型且用Buster (Global Phasing, LTD)改進。12425 Fab之任何原子5 Å內含有原子的FGFR2 D2或FGFR4 D2之

殘基係藉由PyMOL (Schrödinger, LLC)鑑別且列於表23及24中。

FGFR2及SPR分析中之突變誘發

藉由 Quikchange^R 定點誘變套組 (Agilent Technologies) 將 K176A/R210A 雙重突變引入 FGFR2 D2D3 構築體中。WT 與突變型 FGFR2 D2D3 蛋白均使用與 FGFR4 D2 蛋白相同的程序產生。

在 SPR 分析所用的試劑中，親和性純 F(ab)' 片段抗人類 IgG Fc γ 片段 (109-006-098) 購自 Jackson Immuno Research Laboratory。感測晶片 CM5 (BR-1006-068)、甘胺酸 pH 2.0 (BR-1003-55) 及 HBS-EP⁺ 緩衝液 (BR-1006-69) 購自 GE Healthcare。BSA 得自 Gibcor® (15260) 且肝素得自 Sigma^R (H3149-100KU)。

所有 SPR 工作均使用 Biacore® T100、利用評估軟件 1.1 版及 CM5 感測晶片進行。所有實驗均使用 HBS-EP⁺ + 0.5 mg/ml BSA 及 10 μ g/ml 肝素作為運作緩衝液。藉由反應單位 (RU) 度量固著程度及分析物相互作用。進行先導實驗以測試及確認抗人類 Fc 抗體固著及 12425 IgG 子序列捕捉的可行性。

進行 12425 動力學量測時，抗體捕捉於晶片上，且接著使 WT 或突變型 FGFR2 D2D3 蛋白流過。簡言之，在所有四個流動池上，在每分鐘 10 μ l 流速下，使 50 μ g/ml 抗人類 Fc 抗體 (pH 4.75) 經由胺偶合而固著於 CM5 晶片上直至達到 6000 RU。歷時 10 秒將 3 μ g/ml 12425 以每分鐘 10 μ l 注射於測試流動池上。歷時 7 分鐘將 2 倍稀釋的 0.078-100 nM FGFR2 D2D3 蛋白以每分鐘 80 μ l 注射於所有參考流動池及測試流動池上。接著使 HBS-EP⁺ + BSA + 肝素緩衝液流動 10 分鐘以使所結合 12425 解離。每個注射循環之後，用 10 mM 甘胺酸 pH 2 在每分鐘 60 μ l 下使晶片表面再生 70 秒。所有動力學量測均在 25°C 進行。

針對 12425 之 FGFR2 抗原決定基

利用 FGFR2 D2/12425 Fab 複合物之晶體結構鑑別針對 12425 之

FGFR2抗原決定基。晶體之不對稱單元(不對稱單元含有再生完整晶體所需的所有結構資訊)中存在FGFR2 D2/12425 Fab複合物之六個複本。所有六個複本具有與12425 Fab接觸的幾乎相同殘基，但其中因晶體堆積而存在較小變化。僅與12425接觸之彼等FGFR2殘基(所有六個複本共有)用於界定抗原決定基。

FGFR2 D2上之與12425 Fab相互作用的表面係由若干不連續(亦即非鄰接)序列形成：亦即殘基173至176、殘基178、殘基208至210，及殘基212、213、217及219，如表23及24中所詳述。此等殘基形成由12425 Fab結合的三維表面(圖20(A))。藉由結晶學界定的此抗原決定基與藉由氘交換質譜測定法(HDx-MS)所界定者非常一致，此抗原決定基包含殘基160-173、174-189及198-216。

表23：人類FGFR2 D2與12425 Fab重鏈(H)之間的相互作用。FGFR2殘基係根據P21802-3 (SEQ ID NO: 137)編號。Fab重鏈殘基係根據其線性胺基酸序列(SEQ ID NO: 139)編號。所示FGFR2殘基在12425 Fab之原子5 Å內具有至少一個原子，說明潛在的水介導相互作用。

人類FGFR2		12425 Fab		
胺基酸	編號	胺基酸	編號	鏈
LYS	208	HIS	59	H
VAL	209	TYR	57	H
ARG	210	ALA	33	H
		VAL	50	H
		TYR	57	H
		GLU	52	H
		GLU	99	H
		SER	104	H
GLN	212	GLU	52	H
		ASP	54	H
HIS	213	GLU	52	H
		SER	104	H

表24：人類FGFR D2與12425 Fab輕鏈(L)之間的相互作用。FGFR2殘基係根據P21802-3 (SEQ ID NO: 137)編號。Fab輕鏈殘基係根據其線性胺基酸序列(SEQ ID NO: 140)編號。所示FGFR2殘基在12425 Fab之

原子5 Å內具有至少一個原子，說明潛在的水介導相互作用。

人類FGFR2		12425 Fab		
殘基	編號	殘基	編號	鏈
ASN	173	GLN	27	L
THR	174	GLN	27	L
		TYR	92	L
VAL	175	TYR	92	L
LYS	176	ASP	32	L
		HIS	91	L
		TYR	92	L
		ASP	32	L
ARG	178	ASP	32	L
ARG	210	HIS	96	L
ILE	217	TYR	92	L
		PRO	94	L
GLU	219	SER	93	L
		PRO	94	L

根據FGFR2 D2/12425 Fab結構，FGFR2上之潛在N連接糖基化位點，亦即 Asn241 及 Asn288 (Duchesne 等人, (2006) J. Biol. Chem 281:27178-27189)，位於該蛋白質之遠離12425抗原決定基的相對表面上(圖20(A))，表明結合至FGFR2之12425與糖基化無關。此符合以下發現：12425抗體與大腸桿菌所產生(無糖基化)之FGFR2 D2-D3結合的親和性與哺乳動物細胞所產生(糖基化)之FGFR2 D2-D3類似(資料未顯示)。

FGFR2 D2之Lys176及Arg210為兩個分別與12425 Fab輕鏈及重鏈形成最大接觸的抗原決定基殘基。有趣的是，Arg210已顯示可結合肝素(Pellegrini等人, (2000) Nature 407:1029-1034)，此可增強FGFR2結合至FGF及隨後的二聚合及信號傳導。同時，亦假定Lys176位於肝素結合袋囊中(Pellegrini等人, (2000) Nature 407:1029-1034)。在SPR分析中，此等兩個殘基突變為丙胺酸使FGFR2與12425 IgG之結合完全消除(參見上文SPR方法)，證明其在結合12425中的關鍵作用且驗證在晶體結構中所觀測到之抗原決定基。

針對12425之FGFR4抗原決定基

利用FGFR4 D2/12425 Fab複合物之晶體結構鑑別針對12425之FGFR4抗原決定基。晶體之不對稱單元中存在FGFR4 D2/12425 Fab複合物之四個複本。所有四個複本具有與12425 Fab接觸的幾乎相同殘基，但其中因晶體堆積而存在較小變化。僅與12425接觸之彼等FGFR4殘基(所有四個複本共有)用於界定抗原決定基。

FGFR4 D2上之與12425 Fab相互作用的表面係由若干不連續(亦即非鄰接)序列形成：亦即殘基150-151、154、157、160、166-169、171、173-174、201-207、210及212，如表25中所詳述。此等殘基形成由12425 Fab結合的三維表面(圖20(B))。

表25：人類FGFR4 D2與12425 Fab重鏈(H)及輕鏈(L)之間的相互作用。FGFR4殘基係根據P22455-1 (SEQ ID NO: 142)編號。Fab殘基係根據其線性胺基酸序列(SEQ ID NO: 139及140)編號。所示FGFR4殘基在12425 Fab之原子5 Å內具有至少一個原子，說明潛在的水介導相互作用。

人類FGFR4		12425		
胺基酸	編號	胺基酸	編號	鏈
THR	150	TYR	102	H
HIS	151	TYR	102	H
PRO	173	TYR	102	H
ALA	174	TYR	102	H
ARG	201	TYR	57	H
		THR	58	H
		HIS	59	H
LEU	202	TYR	57	H
ARG	203	ALA	33	H
		VAL	50	H
		GLU	52	H
		TYR	57	H
		GLU	99	H

		SER	104	H
HIS	204	ASP	54	H
		SER	56	H
GLN	205	GLU	52	H
		GLY	53	H
		ASP	54	H
		SER	56	H
		TYR	57	H
		THR	101	H
		TYR	102	H
HIS	206	GLU	52	H
		GLU	99	H
		LYS	100	H
		THR	101	H
		TYR	102	H
		SER	103	H
		SER	104	H
TRP	207	TYR	102	H
GLU	212	HIS	59	H
ARG	154	SER	30	L
		SER	31	L
		ASP	32	L
		ASP	50	L
LYS	157	ASP	28	L
HIS	160	TYR	92	L
ASN	166	GLN	27	L
THR	167	ILE	2	L
		GLN	27	L
		ASP	28	L
		TYR	92	L
		SER	93	L
		PRO	94	L
VAL	168	TYR	92	L

LYS	169	ASP	32	L
		HIS	91	L
		TYR	92	L
ARG	171	SER	30	L
		ASP	32	L
		HIS	91	L
		TYR	92	L
ARG	201	PRO	94	L
ARG	203	HIS	96	L
VAL	210	TYR	92	L
		PRO	94	L
GLU	212	SER	93	L
		PRO	94	L
		SER	95	L

FGFR2及FGFR4上之12425抗原決定基之比較

FGFR2與FGFR4上之12425抗原決定基在序列與構形上均非常類似。如序列比對(圖20(C))中所示，FGFR2上之所有抗原決定基殘基(虛線方框)為FGFR4所共有且在FGFR4中具保守性。此外，當兩個複合物結構在12425之可變域上重疊時，兩種抗原之結構疊加的非常好，表明結合至FGFR2與FGFR4之12425的構形非常類似。此為12425與兩種受體之交叉反應性提供結構性解釋。

12425結合及FGFR二聚合

已報導FGFR-FGF-肝素複合物如何在細胞表面上二聚合以活化下游信號傳導的兩種模型，亦即2:2:2模型(FGFR:FGF: 肝素) (Schlessinger 等人，(2000) Mol. Cell 6:743-750)，及2:2:1模型(FGFR:FGF:肝素) (Pellegrini等人，(2000) Nature 407:1029-1034)。根據FGFR2 D2/12425 Fab複合物之晶體結構，12425結合至FGFR2及/或FGFR4不協調且因此可阻斷兩種二聚合模型。

實例24. 調配物

ADC之臨床適用形式(CSF)為瓶裝凍乾物，其含有50 mg 12425-MCC-DM1、16.2 mg丁二酸鈉、410.8 mg蔗糖及1 mg聚山梨醇酯20 (未考慮10%超填以允許取出所稱內容物)。凍乾物用5 mL注射用水復原之後，獲得含有10 mg/mL 12425-MCC-DM1、20 mM丁二酸鈉、240 mM蔗糖及0.02%聚山梨醇酯20的溶液(pH 5.0)。

對於隨後靜脈內投與，通常將所得溶液在載劑溶液中進一步稀釋為即用型ADC溶液用於輸注。

對於CSF而言，根據初步穩定性測試來選擇10 mg/mL之ADC濃度。為了產生等張性調配物，選擇240 mM之蔗糖濃度，以維持非晶形凍乾餅結構且使得蛋白質穩定化。

可選擇最大穩定性調配物的重要穩定性指示分析方法尤其包涵測定聚集度的尺寸排阻層析法、亞可視微粒物測試、游離毒素測定及效能測試。

預篩選研究顯示，0.02%濃度之聚山梨醇酯20提供針對機械應力的足夠穩定化。在即時及加速穩定性條件(25°C及40°C)下的液體及凍乾穩定性研究證明，丁二酸鹽pH 5.0調配物提供整體最佳的儲存穩定性。在此調配物中最值得注意的是，在游離毒素之聚集與釋放之間，所有測試調配物均可達成最佳平衡。在40°C歷時三個月之後，可測定降解產物無顯著增加。

實例25. 腫瘤抗藥性機制及組合療法之使用

預先存在的異質性為多種癌症之共同特徵。臨床上嚴重的腫瘤(及來源於其的細胞株)與其最初致癌事件相隔多代。其必須具有充裕的時間以獲得遺傳上多樣化子群(Nowell, Science 194: 23-28 (1976))，而不必依賴於生存者共同的遺傳驅動性病灶。若此等子群配合度足以連續世代傳承，而非治療各患者之單一純系腫瘤，則事實上治療複雜群體。因此，致癌基因或腫瘤抑制基因之擴增不同的純系群體之存在

可解釋對單一療法的敏感性或抗藥性且需要靶向組合療法。

FGFR2表現在FGFR2擴增性SNU 16細胞中及在FGFR2擴增性人類腫瘤中具異質性。

藉由免疫組織化學(IHC)、流式細胞術及/或螢光原位雜交、使用此項技術中已知及本文所述的方法量測SNU16細胞中之FGFR2表現。石蠟包埋之親本SNU 16細胞離心塊之IHC染色揭示FGFR2染色強度之範圍。另外，培養物中擴增之SNU 16細胞表面上之FGFR2表現亦顯示FGFR2之表現值範圍，如藉由流式細胞術所量測。有趣的是，當細胞群體針對EGFR共染色時，似乎存在EGFR陽性細胞之子群。根據FISH，預處理細胞阻斷製劑中散佈之EGFR擴增性細胞(<5%)亦為明顯的，然而當藉由qPCR檢查群體時，處理之前的群體中未偵測到EGFR擴增，可能由於表現量較低。

發現藉由qPCR及7 (2.4%)評估的296個人類胃腫瘤樣品中之FGFR2複本數增加(例如基因複本數為約4)。來自具有最高FGFR2複本數之一組樣品中之9個樣品的IHC染色揭示各樣品具有呈陽性的腫瘤區域及根據FGFR2表現呈陰性的區域。免疫反應性與任何特定腫瘤形態無關。在所有九種情況下，當利用FGFR2免疫反應性遮掩連續切片而對腫瘤樣品進行微解剖時，來自此等FGFR2陽性及陰性區域的DNA分別與FGFR2基因擴增或非擴增相關。FGFR2之過度表現與擴增的相關性藉由深度測序來確認，如下文所述。

EGFR在抗BGJ398的SNU 16細胞中過度表現且擴增，且FGFR2表現及擴增消失

SNU 16細胞(ACCT CRL-5974)在0.5 μ M BGJ398及RPMI-1640培養基 + 10% FBS (ATCC目錄#30-2001)中培養，隨後使BGJ398濃度自0.5 μ M增加至1.0 μ M至2.5 μ M至5.0 μ M。更換培養基且每週一次添加新鮮BGJ398 (5 μ M)歷時6週。細胞在回收細胞培養物冷凍培養基

(GIBCO® #12648-101)中冷凍且在RPMI-1640 + 10% FBS中復原。解凍之抗性細胞株繼代隨後在1 μ M BGJ398選擇下維持。在BGJ398選擇下在培養物中保持的SNU 16細胞最後對生長抑制不太敏感，其中就對抗藥性細胞的敏感性而言，IC₅₀自1.7 nM分別增加至2.4 μ M。

西方墨點分析BGJ398抗性SNU 16細胞顯示，抗性細胞群體中的FGFR2表現消失且抗性細胞群體不再經由p-FRS2發生信號傳導，表示FGFR2信號傳導途徑不再具有活性。抗性群體改為高量表現EGFR及pEGFR，表示細胞信號傳導改為經由EGFR途徑進行。BGJ398抗性SNU 16細胞亦展現EGFR DNA複本數之增加(如藉由qPCR所量測)，與預處理之SNU16細胞相比，EGFR DNA複本數增加與蛋白質表現之增強相關。BGJ398抗性細胞繼續生長，但生長速率慢於親本(未處理)細胞株，與親本SNU 16細胞之36小時相比，其時間倍增為125小時。

SNU 16細胞之BGJ398抗性之起始導致對EGFR抑制劑吉非替尼產生獲得性敏感性(圖21)。對SNU 16親本細胞及BGJ398抗性細胞進行的細胞生長分析顯示，吉非替尼IC₅₀分別自> 10 μ M轉變為16.7 nM，證明致癌基因依賴性自FGFR2轉變為EGFR。

已顯示轉型致癌基因FGFR2擴增的細胞株含有已擴增且依賴於第二致癌基因EGFR的預存在細胞。當FGFR2擴增性細胞株SNU 16置放於FGFR激酶抑制劑之壓力下時，一個群體被排除且一個子群變為主導；預期當異質腫瘤置放於選擇性壓力下(諸如靶向療法)時，可有利於子群生長且引起臨床抗性。

深度測序揭示人類胃癌試樣中預先存在其他致病病灶

取自過度表現FGFR2之腫瘤區域及不存在FGFR2過度表現之腫瘤區域的成對腫瘤樣品之微解剖區域之深度測序顯示與FGFR2擴增存在相關性。具有FGFR2過度表現的所有腫瘤區域展現FGFR2複本數擴增(複本數6-16)，而不具有FGFR2過度表現的腫瘤區域未展現FGFR2複

本數擴增。與上述SNU 16之發現一致，一個腫瘤僅在非FGFR2擴增區域中展現EGFR擴增。EGFR擴增與kras擴增在此試樣中共發生。此觀測結果符合先前報導，表明kras擴增為經抗EGFR療法治療之癌症的抗性機制(Valtorta,等人, IJC (2013) 133:1259-1266；Misale,等人, Nature (2012) 486:532-538)。

其他腫瘤展現替代受體酪胺酸激酶之擴增。舉例而言，一腫瘤對在FGFR2擴增區域與FGFR2未擴增區域中均具有Her2擴增，而另一腫瘤僅在非FGFR2擴增區域中鑑別有IGF1R擴增。所有腫瘤中之所有區域似乎在p53中具有突變。已鑑別出若干個其他突變，但未始終發現於樣品組中。當施加選擇性壓力(諸如靶向療法(例如抗FGFR2療法))時，此等預先存在的較小群體(初始非盛行受體酪胺酸激酶擴增)可為抗性細胞之來源。

亦已證明，具有FGFR2擴增的人類原發腫瘤含有其他酪胺酸激酶擴增之子群，且此子群擴增有時發生於不具有FGFR2擴增的腫瘤區域中。回憶其他研究(Snuderl,等人(2011) Cancer Cell 20: 810-817)，所有腫瘤區域亦含有共同突變，在此情況下為p53突變，表明腫瘤在總體上存在共同祖先。

FGFR2在表現Her2之腫瘤中的抗性機制

FGFR2擴增已表明為經拉帕替尼處理後之乳癌細胞的抗性機制(Azuma,等人(2011) Biochem Biophys Res Comm, 407:219-224)，且注意到FGFR2表現係在對拉帕替尼具有不良反應的乳癌患者受到過度表現。已藉由深度測序證明，Her2擴增之人類胃腫瘤樣品具有FGFR2擴增性細胞之預先存在子群(Deeds等人, United States and Canadian Academy of Pathology, 2014年3月：摘要編號：453290)。此表明FGFR2擴增可代表其他Her2擴增性腫瘤在抗Her2療法之後的抗性機制。因此，Her2療法與FGFR2療法組合治療(例如FGFR2抗體與本文所述

ADC)適用於治療表現Her2之癌症及/或Her2抗性癌症。

此等資料表明，FGFR2療法(例如本文所述FGFR2 ADC)可與其他酪胺酸激酶抑制劑組合用於治療癌症。另外，本文所述的FGFR2 ADC可適用於治療對其他癌症療法具有抗性的患者群體，其他癌症療法包括其他酪胺酸激酶抑制劑(例如Her2抑制劑、Her3抑制劑、EGFR抑制劑、Met抑制劑及IGFR抑制劑)。

應瞭解，本文所述之實例及實施例僅出於說明目的，且熟習此項技術者可想到其不同潤飾或修改且此等潤飾或修改應包括於本申請案之精神及範圍內以及隨附申請專利範圍之範疇內。

【符號說明】

無

發明摘要

※ 申請案號：103108773

※ 申請日：103 年 7 月 12 日

A61K39/395 (2006.01)

※IPC 分類：A61K31/537 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【中文】

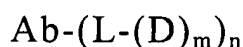
本發明係關於抗FGFR2及抗FGFR4抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其用於治療癌症之用途。

【英文】

The present invention relates to anti-FGFR2 and FGFR4 antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

申請專利範圍

1. 一種具有下式之抗體藥物結合物，



其中

Ab為特異性結合至人類FGFR2與FGFR4之抗體或其抗原結合
片段；

L為連接子；

D為藥物部分；

m為整數1至8；及

n為整數1至10。

2. 如請求項1之抗體藥物結合物，其中該m為1。
3. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該n為3或4。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之所有同功異型物。
5. 如請求項1至4中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2上之包含SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基176 (Lys)及210 (Arg)的抗原決定基。
6. 如請求項1至5中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基173 (Asn)、174 (Thr)、175 (Val)、176 (Lys)、178 (Arg)、208 (Lys)、209 (Val)、210 (Arg)、212 (Gln)、213 (His)、217 (Ile)及219 (Glu)。
7. 如請求項1至6中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之包含SEQ ID NO: 136或SEQ ID NO: 141的抗原決定基。
8. 如請求項1至6中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原

結合片段特異性結合至人類FGFR2之由SEQ ID NO: 136或SEQ ID NO: 141組成的抗原決定基。

9. 如請求項1至8中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之包含SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基169 (Lys)及203 (Arg)之抗原決定基。
10. 如請求項1至9中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之包含SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基176 (Lys)及210 (Arg)的抗原決定基及人類FGFR4之包含SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基169 (Lys)及203 (Arg)的抗原決定基。
11. 如請求項1至10中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合SEQ ID NO: 142之人類FGFR4之胺基酸殘基150 (Thr)、151 (His)、154 (Arg)、157 (Lys)、160 (His)、166 (Asn)、167 (Thr)、168 (Val)、169 (Lys)、171 (Arg)、173 (Pro)、174 (Ala)、201 (Arg)、202 (Leu)、203 (Arg)、204 (His)、205 (Gln)、206 (His)、207 (Trp)、210 (Val)及212 (Glu)。
12. 如請求項1至11中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之包含SEQ ID NO: 132或133的抗原決定基。
13. 如請求項1至11中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之由SEQ ID NO: 132或133組成的抗原決定基。
14. 如請求項1至13中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 1、21、41、61、81或101之VH CDR1；(b) SEQ ID NO: 2、22、42、62、82或102之VH CDR2及(c) SEQ ID NO: 3、23、

43、63、83或103之VH CDR3，其中該CDR係根據Kabat定義加以定義。

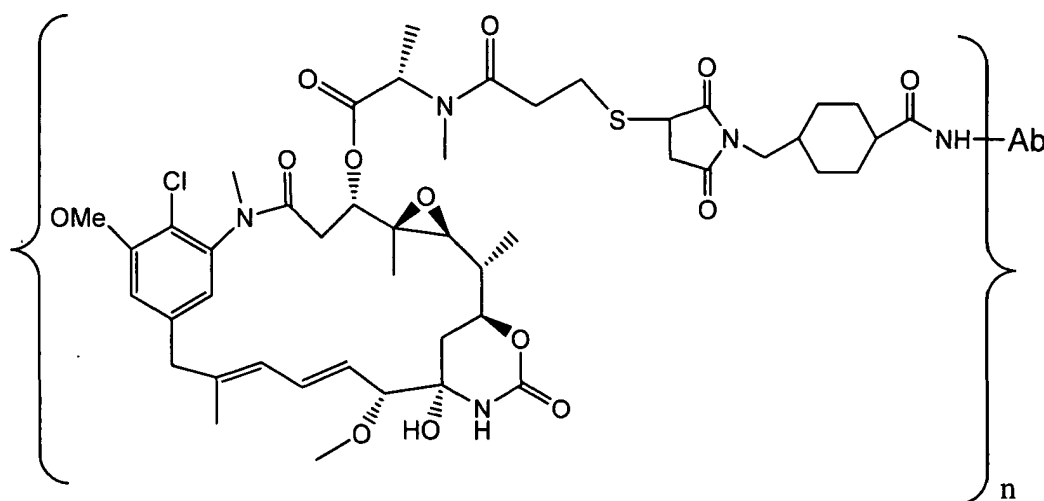
15. 如請求項14之抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段進一步包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 11、31、51、71、91或111之VL CDR1；(b) SEQ ID NO: 12、32、52、72、92或112之VL CDR2；及(c)SEQ ID NO: 13、33、53、73、93或113之VL CDR3，其中該CDR係根據Kabat定義加以定義。
16. 如請求項15之抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 7、27、47、67、87或107之VH區域及SEQ ID NO: 17、37、57、77、97或117之VL區域。
17. 如請求項16之抗體藥物結合物，其中該抗體係由SEQ ID NO: 9、29、49、69、89或109之重鏈及SEQ ID NO: 19、39、59、79、99或119之輕鏈組成。
18. 如請求項1之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段與由SEQ ID NO: 9、29、49、69、89或109之重鏈及SEQ ID NO: 19之輕鏈組成的抗體交叉競爭結合至人類FGFR2及FGFR4。
19. 如請求項1之抗體藥物結合物，其中與由SEQ ID NO: 9、29、49、69、89或109之重鏈及SEQ ID NO: 19、39、59、79、99或119之輕鏈組成的抗體相比，該抗體或抗原結合片段具有增強的ADCC活性。
20. 如請求項1之抗體藥物結合物，其中與由SEQ ID NO: 9、29、49、69、89或109之重鏈及SEQ ID NO: 19、39、59、79、99或119之輕鏈組成的抗體相比，該抗體或抗原結合片段不具有增強的ADCC活性。
21. 如請求項1至20中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體為人類

抗體。

22. 如請求項1至21中任一項之抗體藥物結合物，其中該抗體為單株抗體。
23. 如請求項1至22中任一項之抗體藥物結合物，其中該連接子係選自由以下組成之群：可分裂連接子、不可分裂連接子、親水性連接子、預帶電連接子(procharged linker)及基於二羧酸之連接子。
24. 如請求項23之抗體藥物結合物，其中該連接子衍生自選自由以下組成之群之交聯試劑：3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)、4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(sulfo-SPDB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺基丁二醯亞胺酯(sulfo-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)。
25. 如請求項24之抗體藥物結合物，其中該連接子衍生自交聯試劑4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)。
26. 如請求項1至25中任一項之抗體藥物結合物，其中該藥物部分係選自由以下組成之群：V-ATP酶抑制劑、促細胞凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧利斯他汀(auristatin)、海兔毒素(dolastatin)、類美登素(maytansinoid)、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、蛋白質CRM1之核輸出抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶

體抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損壞劑、DNA烷基化劑、DNA插入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。

27. 如請求項26之抗體藥物結合物，其中該細胞毒性劑為類美登素。
28. 如請求項27之抗體藥物結合物，其中該類美登素為N(2')-去乙醯基-N(2')-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素(DM1)或N(2')-去乙醯基-N2-(4-巰基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)。
29. 如請求項1之抗體藥物結合物，其具有下式：



其中Ab為抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 1、21、41、61、81或101之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 2、22、42、62、82或102之重鏈CDR2；SEQ ID NO: 3、23、43、63、83或103之重鏈CDR3；及SEQ ID NO: 11、31、51、71、91或111之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 12、32、52、72、92或112之輕鏈CDR2；SEQ ID NO: 13、33、53、73、93或113之輕鏈CDR3，其中該CDR係根據Kabat定義加以定義；且

n為1至10。

30. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物及醫藥學上可接受之載劑。
31. 如請求項30之醫藥組合物，其中該組合物係製備呈凍乾物。
32. 如請求項31之醫藥組合物，其中該凍乾物包含該抗體藥物結合物、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20。
33. 一種治療有需要之患者之FGFR2陽性癌症及/或FGFR4陽性癌症的方法，其包含向該患者投與如請求項1至30中任一項之抗體藥物結合物，或如請求項30至32中任一項之醫藥組合物。
34. 如請求項29之方法，其中該癌症具有增加之FGFR2基因複本數或PAX3-FOXO易位。
35. 如請求項33之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群：胃癌、乳癌、橫紋肌肉瘤、肝癌、腎上腺癌、肺癌、食道癌、結腸癌及子宮內膜癌。
36. 如請求項33或34之方法，進一步包含向該患者投與酪胺酸激酶抑制劑、IAP抑制劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑或另一FGFR2抑制劑。
37. 如請求項36之方法，其中該另一FGFR2抑制劑為3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲或其醫藥學上可接受之鹽。
38. 如請求項33或35之方法，其中該癌症對酪胺酸激酶抑制劑具有抗性。
39. 如請求項38之方法，其中該酪胺酸激酶抑制劑為EGFR、Her2、Her3、IGFR或Met抑制劑。
40. 一種治療患者之對Her2抑制劑具抗性之癌症的方法，包含向該患者投與如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物，或如請求項30至32中任一項之醫藥組合物。

41. 如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物，係用作藥劑。
42. 如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物或如請求項31至33中任一項之醫藥組合物，其用於治療FGFR2陽性癌症或FGFR4陽性癌症。
43. 如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物或如請求項31至33中任一項之醫藥組合物，其用於治療對酪胺酸激酶抑制劑具有抗性之癌症。
44. 如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物或如請求項30至32中任一項之醫藥組合物，其用於治療對EGFR、Her2、Her3、IGFR或Met抑制劑具有抗性之癌症。
45. 一種特異性結合至FGFR2及FGFR4的抗體或其抗原結合片段。
46. 如請求項45之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2上之包含SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基176 (Lys)及210 (Arg)的抗原決定基。
47. 如請求項46之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基173 (Asn)、174 (Thr)、175 (Val)、176 (Lys)、178 (Arg)、208 (Lys)、209 (Val)、210 (Arg)、212 (Gln)、213 (His)、217 (Ile)及219 (Glu)。
48. 如請求項47之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之包含SEQ ID NO: 136或SEQ ID NO: 141的抗原決定基。
49. 如請求項46至48之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之包含SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基169 (Lys)及203 (Arg)的抗原決定基。
50. 如請求項45之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR2之包含SEQ ID NO: 137之胺基酸殘基

176 (Lys)及210 (Arg)的抗原決定基及人類FGFR4之包含SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基169 (Lys)及203 (Arg)的抗原決定基。

51. 如請求項45至50中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合SEQ ID NO: 142之胺基酸殘基150 (Thr)、151 (His)、154 (Arg)、157 (Lys)、160 (His)、166 (Asn)、167 (Thr)、168 (Val)、169 (Lys)、171 (Arg)、173 (Pro)、174 (Ala)、201 (Arg)、202 (Leu)、203 (Arg)、204 (His)、205 (Gln)、206 (His)、207 (Trp)、210 (Val)及212 (Glu)。
52. 如請求項45至51中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之包含SEQ ID NO: 132或133的抗原決定基。
53. 如請求項45至51中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類FGFR4之由SEQ ID NO: 132或133組成的抗原決定基。
54. 如請求項45至53中任一項之抗體或抗原結合片段，其包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 1、21、41、61、81或101之VH CDR1；(b) SEQ ID NO: 2、22、42、62、82或102之VH CDR2及(c) SEQ ID NO: 3、23、43、63、83或103之VH CDR3，其中該CDR係根據Kabat定義加以定義。
55. 如請求項54之抗體或抗原結合片段，其進一步包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(a) SEQ ID NO: 11、31、51、71、91或111之VL CDR1；(b) SEQ ID NO: 12、32、52、72、92或112之VL CDR2；及(c)SEQ ID NO: 13、33、53、73、93或113之VL CDR3，其中該CDR係根據Kabat定義加以定義。
56. 如請求項55之抗體或抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 7、27、47、67、87或107之VH區域及SEQ ID NO: 17、37、57、77、97

或117之VL區域。

57. 如請求項56之抗體，其係由SEQ ID NO: 9、29、49、69、89或109之重鏈及SEQ ID NO: 19、39、59、79、99或119之輕鏈組成。
58. 如請求項45之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段與如請求項57之抗體或抗原結合片段交叉競爭結合至人類FGFR2及FGFR4。
59. 如請求項45之抗體或抗原結合片段，其中與如請求項59之抗體相比，該抗體或抗原結合片段具有增強的ADCC活性。
60. 如請求項45至59中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體為人類抗體。
61. 如請求項45至60中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體為單株抗體。
62. 如請求項45至61中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段為單鏈抗體(scFv)。
63. 一種核酸，其編碼如前述請求項中任一項之抗體或抗原結合片段。
64. 一種載體，其包含如請求項63之核酸。
65. 一種宿主細胞，其包含如請求項64之載體。
66. 一種用於製備抗體或抗原結合片段的方法，其包含培養如請求項65之宿主細胞及自培養物中回收該抗體。
67. 一種製備抗FGFR2及FGFR4抗體藥物結合物的方法，其包含：
 - (a)使SMCC與藥物部分DM-1化學連接；
 - (b)使該連接子-藥物與自請求項66之細胞培養物中回收的抗體結合；及
 - (c)純化該抗體藥物結合物。

68. 一種根據請求項67製備的抗體藥物結合物，其具有約3.5之平均DAR，如UV光譜儀所測量。
69. 一種診斷試劑，其包含經標記之如請求項45至62中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項1至29中任一項之抗體藥物結合物。
70. 如請求項69之診斷試劑，其中該標記係選自由以下組成之群：
放射性標記、螢光團、發色團、成像劑及金屬離子。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（4A）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】：

$\text{Ab}-(\text{L}-(\text{D})_m)_n$