



No. 16-050106- -00000-0000

Fecha: 2016-02-26 16:05:29 Dep: 2020 DIR NUEVAS CR
Tra: 11 PATENTE IYI Eva: 378 FASE NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 101

Hcm

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

ANTICUERPOS ANTI-FGFR2IIIb AFUCOSILADOS

54. **TITULO** _____

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** _____

FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.

DOMICILIO _____

SOUTH SAN FRANCISCO CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** _____

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

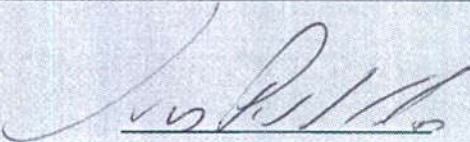
22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

AS. 135.461

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2014/049008	Fecha 31.07.2014
Publicación Internacional No.		WO 2015/017600	Fecha 05.02.2015
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-FGFR2IIIB AFUCOSILADOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1 FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Two Corporate Drive, 94080	No. TELÉFONO
CIUDAD		South San Francisco	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		CA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		US	US
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1 HARDING		Thomas	GB
2 PIERCE		Kristen	US
3 PATIL		Namrata	US
4 BRENNAN		Thomas	US
5 HAMBLETON		Julie	US
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1 US	CA	South San Francisco	Two Corporate Drive, 94080
2 US	CA	South San Francisco	Two Corporate Drive, 94080
3 US	CA	South San Francisco	Two Corporate Drive, 94080
4 US	CA	South San Francisco	Two Corporate Drive, 94080
5 US	CA	South San Francisco	Two Corporate Drive, 94080
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C. 80.410.337 T.P. 57492
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO 7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@bc.com.co
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1 US		US	61/861,198 2013/08/01
2 US		US	61/901,732 2013/11/08
3 US		US	61/933,632 2014/01/30

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 16-177	Fecha: 13.01.2016
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 4-75		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 57		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar:	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

WO 2015/017600 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2014/049008

(22) International Filing Date:
31 July 2014 (31.07.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/861,198 1 August 2013 (01.08.2013) US
61/901,732 8 November 2013 (08.11.2013) US
61/933,632 30 January 2014 (30.01.2014) US

(71) Applicant: FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.
[US/US]; Two Corporate Drive, South San Francisco,
California 94080 (US).

(72) Inventors: HARDING, Thomas; Two Corporate Drive,
South San Francisco, California 94080 (US); PIERCE,
Kristen; Two Corporate Drive, South San Francisco, Cali-
fornia 94080 (US); PATIL, Namrata; Two Corporate
Drive, South San Francisco, California 94080 (US);
BRENNAN, Thomas; Two Corporate Drive, South San
Francisco, California 94080 (US); HAMBLETON, Julie;
Two Corporate Drive, South San Francisco, California
94080 (US).

(74) Agent: SCARR, Rebecca B.; 2275 Deming Way, Suite
310, Middleton, Wisconsin 53562 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report (Art. 21(3))
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIb ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention provides antibodies that bind FGFR2IIIb, wherein the antibodies are afucosylated. The present invention provides compositions comprising antibodies that bind FGFR2IIIb, wherein at least 95% of the antibodies in the composition are afucosylated. In some embodiments, methods of treating cancer comprising administering afucosylated anti-FGFR2IIIb antibodies are provided.

ANTICUERPOS ANTI-FGFR2IIIB AFUCOSILADOS

CAMPO DE LA INVENCION

Se proporcionan anticuerpos anti-FGFR2IIb afucosilados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los miembros de la familia del factor del crecimiento de los fibroblastos (FGF) se unen a cuatro receptores de tirosina cinasa conocidos, receptores del factor del crecimiento de los fibroblastos 1-4 (FGFR1-4) y sus isoformas, con los diferentes FGFs que se unen a diferentes FGFRs en varios grados (Zhang et al., J. Biol. Chem. 281:15694, 2006). Una secuencia de proteína de FGFR2 humano es proporcionada en, *por ejemplo*, GenBank Locus AF487553. Cada FGFR consiste de un dominio extracelular (ECD) que comprende tres dominios (D1, D2 y D3), similares a inmunoglobulina (Ig), una sola hélice transmembranal, y un dominio de cinasa catalítico intracelular (Mohammadi et al., Cytokine Growth Factor Revs, 16:107, 2005). Existe una extensión contigua de aminoácidos ácidos en el enlazante entre D1 y D2 llamada la "casilla ácida" (AB). Se cree que la región que contiene D1 y AB está implicada en la autoinhibición del receptor, el cual no es relevado por la unión al ligando. Los FGFs se unen a los receptores principalmente a través de regiones en D2 y D3 de los receptores. Los FGFRs se caracterizan por múltiples empalmes alternativos de sus ARNms, conduciendo a una variedad de isoformas (Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271:15292, 1996; véase también Swiss-Prot P21802 y los isoformas P21802-1 a -20 para secuencias de FGFR2 y sus isoformas). De manera notable, existen formas que contienen los tres dominios de Ig (isoformo α) o únicamente los dos dominios D2 y D3 de Ig sin el dominio D1 (isoformo β). En el FGFR1 - FGFR3, todas las formas contienen la primera mitad de D3 denotada por IIIa, pero pueden ser utilizados dos exones alternativos para la segunda mitad de D3, conduciendo a las formas IIIb y IIIc. Para el FGFR2, esas son denotadas respectivamente como FGFR2IIIb y FGFR2IIIc (o sólo FGFR2b y FGFR2c); las formas beta correspondientes son denotadas como FGFR2(beta)IIIb y FGFR2(beta)IIIc. La forma FGFR2IIIb del FGFR2 (también denotada como K-sam-II) es un receptor de alta afinidad para ambos miembros de la familia FGF1 y KGF (FGF7, FGF10, y FGF22) mientras que el FGFR2IIIc (también denotado como K-sam-I) se une a ambos de FGF1 y FGF2 también pero no se une a los miembros de la familia de KGF (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:246, 1992). En realidad, el FGFR2IIIb es el único receptor para los miembros de la familia del KGF (Ornitz et al., 1996, *op. cit.*) y por

lo tanto también es designado como KGFR.

Los FGFRs y sus isoformas son expresados de manera diferencial en varios tejidos. El FGFR2IIIb (y las formas IIIb del FGFR1 y FGFR3) es expresado en tejidos epiteliales, mientras que el FGFRIIIc es expresado en tejidos mesenquimales (Duan et al., J. Biol. Chem. 267:16076, 1992; Ornitz et al., 1996, *op. cit.*). Ciertos ligandos de FGF de esos receptores tienen un patrón de expresión opuesto. De este modo, los miembros de la subfamilia del KGF, incluyendo FGF7 (KGF), FGF10, y FGF22, se unen únicamente al FGFRIIIb (Zhang et al., *op. cit.*) y son expresados en tejidos mesenquimales de modo que pueden ser efectores paracrinós de células epiteliales (Ornitz et al., 1996, *op. cit.*). En contraste, los miembros de la subfamilia del FGF4 se unen al FGFR2IIIc y son expresados en linajes tanto epiteliales como mesenquimales de modo que pueden tener funciones autocrinas o paracrinós. Debido a los patrones de expresión de los isoformas de FGFR2 y sus ligandos, el FGFR2 juega un papel en las interacciones epiteliales-mesenquimales (Finch et al., Dev. Dyn. 203:223, 1995), de modo que no es sorprendente que la modificación del FGFR2IIIb en ratones conduzca a defectos embrionicos severos y letalidad (De Moerlooze et al., Development 127:483, 2000).

El KGF (FGF7) y KGFR (FGFR2IIIb) son sobreexpresados en muchos cánceres pancreáticos (Ishiwata et al., Am. J. Pathol. 153: 213, 1998), y su coexpresión se correlaciona con un pobre pronóstico (Cho et al., Am. J. Pathol. 170:1964, 2007). Las mutaciones somáticas del gen de FGFR2 fueron encontradas en 12% de un panel grande de carcinomas endometriales (uterinos), y en varios casos probados fueron requeridos para la supervivencia de células tumorales (Dutt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8713, 2008). En dos tumores se encontró que la mutación del FGFR2 es la misma que la sustitución S252W asociada con el síndrome de Apert. La amplificación y sobreexpresión del FGFR2 está asociada con el tipo difuso, no diferenciado del cáncer gástrico, que tiene un pronóstico particularmente pobre, y la inhibición de la actividad de FGFR2 por compuestos de molécula pequeña que inhibieron potencialmente la proliferación de esas células cancerosas (Kunii et al., Cancer Res. 68:2340, 2008; Nakamura et al., Gastroenterol. 131:1530, 2006).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En algunas modalidades, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb, donde la región variable de cadena pesada comprende: (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (ii) HVR-H2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; y donde la región variable de cadena ligera comprende: (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; donde el anticuerpo está afucosilado. En algunas modalidades, el anticuerpo carece de fucosa Asn297. En algunas modalidades, son proporcionadas composiciones que comprenden una pluralidad de anticuerpos anti-FGFR2IIIb, donde la región variable de cadena pesada de cada anticuerpo anti-FGFR2IIIb en la composición comprende: (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; y donde la región variable de cadena ligera de cada anticuerpo anti-FGFR2IIIb en la composición comprende: (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; donde al menos 95% de los anticuerpos en la composición están afucosilados. En algunas modalidades, la composición puede ser un sobrenadante de una línea celular productora de anticuerpo. En algunas modalidades, la composición puede ser una composición amortiguada. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, es proporcionada una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados, donde los anticuerpos compiten por la unión al FGFR2IIIb con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4

y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos quiméricos. En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En cualquiera de las modalidades descritas aquí, los anticuerpos pueden comprender una región constante de cadena ligera κ . En cualquiera de las modalidades descritas aquí, los anticuerpos pueden comprender una región constante de cadena pesada IgG1.

En algunas modalidades, los anticuerpos tienen actividad de ADCC mejorada *in vitro* comparada con los anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados que tienen la misma secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados causan una lisis específica que es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 65, al menos 70, o al menos 75 puntos porcentuales de la lisis específica con anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados. En algunas modalidades, la actividad de ADCC es determinada usando células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb como células blanco y PBMCs humanas aisladas como células efectoras.

En algunas modalidades, los anticuerpos tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA en comparación con los anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados que tienen la misma secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados se unen a Fc gamma RIIIA con al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 17 veces, o al menos 20 veces mayor afinidad que los anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados. En algunas modalidades, la afinidad por Fc gamma RIIIA es determinada usando resonancia plasmónica superficial. En algunas modalidades, Fc gamma RIIIA es seleccionado de Fc gamma RIIIA(V158) y Fc gamma RIIIA(F158). En algunas modalidades, el Fc gamma RIIIA es Fc gamma RIIIA(V158).

En cualquiera de las modalidades descritas aquí, los anticuerpos pueden unirse a FGFR2IIIb pero no a FGFR2IIIC.

En cualquiera de las modalidades descritas aquí, una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados comprende al menos 95% de anticuerpos afucosilados. En cualquiera de las

modalidades descritas aquí, una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados puede tener fucosilación detectable. En algunas modalidades, la presencia de fucosa puede ser determinada por un método que comprende cromatografía de líquidos de alto desempeño, (HPLC), electroforesis capilar, o espectrometría de masas MALDI-TOF.

En algunas modalidades, se proporcionan células anfitrionas que comprenden ácido nucleico que codifica para un anticuerpo anti-FGFR2IIIb descrito aquí, donde la célula anfitriona carece de un gen alfa-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) funcional. En algunas modalidades, la célula anfitriona es una célula CHO.

En algunas modalidades, son proporcionados métodos para producir anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados. En algunas modalidades, un método comprende cultivar una célula anfitriona bajo condiciones adecuadas para expresar ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-FGFR2IIIb, donde la célula anfitriona carece de un gen alfa-1,6-fucosiltransferasa funcional (FUT8). En algunas modalidades, un método para producir anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados comprende cultivar la célula anfitriona bajo condiciones adecuadas para producir un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado. En algunas modalidades, el método comprende además recuperar el anticuerpo anti-FGFR2IIIb producido por la célula anfitriona. En algunas modalidades, menos del 5% de los anticuerpos anti-FGFR2IIIb producidos por la célula anfitriona comprenden fucosa. En algunas modalidades, al menos 95% de los anticuerpos anti-FGFR2IIIb producidos por la célula anfitriona carecen de fucosa (es decir, están afucosilados). En algunas modalidades, la fucosa es indetectable en los anticuerpos anti-FGFR2IIIb producidos por la célula anfitriona. En algunas modalidades, la presencia de fucosa es detectada por un método que comprende HPLC, electroforesis capilar, o espectrometría de masas MALDI-TOF.

En algunas modalidades, son proporcionadas composiciones farmacéuticas, donde la composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados descritos aquí y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos de tratamiento de cáncer. En algunas modalidades, un método comprende administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico,

cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, y cáncer esofágico. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico. En algunas modalidades, el cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la amplificación de FGFR2 comprende una relación de FGFR2:CEN10 (centrómero del cromosoma 10) de >3 . En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es mayor de 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende la amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la expresión o sobreexpresión de FGFR2IIIb es determinada por IHC. En algunas modalidades, la tinción 1+, 2+ o 3+ de las células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción 2+ o 3+ en células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción con IHC es calificada como se describe en el Ejemplo 6.

En algunas modalidades, un método de tratamiento de cáncer comprende además administrar al menos un agente terapéutico adicional seleccionado de un agente de platino, paclitaxel, ABRAXANE®, docetaxel, gemcitabina, capecitabina, irinotecano, epirrubicina, FOLFOX, FOLFIRI, leucovorina, fluorouracilo, mitomicina C, y clorhidrato de doxorubicina. En algunas modalidades, el agente de platino es seleccionado de cisplatino, oxaliplatino, y carboplatino. En algunas modalidades, un método de tratamiento de cáncer comprende además administrar paclitaxel. En algunas modalidades, un método de tratamiento de cáncer comprende además administrar cisplatino y/o 5-FU.

En algunas modalidades, se proporcionan usos de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, ese uso es para tratar el cáncer en un individuo con cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, o cáncer esofágico. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico. En algunas modalidades, el cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la amplificación de FGFR2 comprende una relación de

FGFR2:CEN10 (centrómero del cromosoma 10) de >3 . En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es mayor de 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la expresión o sobreexpresión de FGFR2IIIb es determinada por IHC. En algunas modalidades, la tinción 1+, 2+ o 3+ de las células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción 2+ o 3+ en células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción con IHC es calificada como se describe en el Ejemplo 6.

En algunas modalidades, son proporcionadas composiciones farmacéuticas para tratar el cáncer, donde la composición farmacéutica comprende los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, o cáncer esofágico. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico. En algunas modalidades, el cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la amplificación de FGFR2 comprende una relación de FGFR2:CEN10 (centrómero del cromosoma 10) de >3 . En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es mayor de 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende la amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la expresión o sobreexpresión de FGFR2IIIb es determinada por IHC. En algunas modalidades, la tinción 1+, 2+ o 3+ de las células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción 2+ o 3+ en células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción con

IHC es calificada como se describe en el Ejemplo 6.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A a 1C muestran la actividad de ADCC de α FGFR2bA afucosilado y α FGFR2bF fucosilado contra células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb, como se discute en el Ejemplo 3. En las leyendas, " α FGFR2bF / FGFR2b" indican que el anticuerpo α FGFR2bF fucosilado fue probado contra células blanco Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb.

Las Figuras 2A a 2D muestran la eficacia de α FGFR2bA afucosilado y α FGFR2bF fucosilado en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico OCUM-2M, a (A y B) 10 mg/Kg y (C y D) 3 mg/Kg, como se discute en el Ejemplo 4.

Las Figuras 3A y 3B muestran la eficacia dependiente de la dosis de α FGFR2bA afucosilado en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico OCUM-2M, como se discute en el Ejemplo 4.

Las Figuras 4A y 4B muestran la eficacia de la terapia de combinación con α FGFR2bA afucosilado y paclitaxel en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico OCUM-2M, como se discute en el Ejemplo 4.

Las Figuras 5A y 5B muestran la eficacia de la terapia de combinación con α FGFR2bA afucosilado y 5-FU/cisplatino en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico OCUM-2M, como se discute en el Ejemplo 4.

Las Figuras 6A y 6B muestran la eficacia de α FGFR2bA afucosilado en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MFM-223, como se discute en el Ejemplo 4.

La Figura 7 muestra el perfil de glicano del anticuerpo de α FGFR2b producido en (A) células CHOK1SV Potelligent® y (B) células CHOK1SV, como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 8 muestra diagramas esquemáticos de glicanos ligados a N típicamente encontrados en anticuerpos.

La Figura 9 muestra la ADCC de células Ba/F3 FGF2b con concentraciones crecientes de α FGFR2bA o α FGFR2bF. Los ensayos fueron efectuados con PBMC humanas normales a una relación de E:T de 25:1, como se describe en el Ejemplo 5. Los datos se graficaron como liberación de LDH.

La Figura 10 muestra la ADCC de células OCUM-2M con concentraciones crecientes de α FGFR2bA o α FGFR2bF. Los ensayos fueron efectuados con PBMC humanas normales a una relación de E:T de 25:1. Como se describe en el Ejemplo 5. Los datos se graficaron como el porcentaje de lisis específica.

Las Figuras 11A a 11F muestran la detección de FGFR2IIIb en muestras de tejido tumoral usando inmunohistoquímica, como se describe en el Ejemplo 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan anticuerpos afucosilados que se unen a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, también son proporcionadas cadenas pesadas y cadenas ligeras del anticuerpo afucosilado que son capaces de formar anticuerpos que se unen a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, son proporcionados anticuerpos afucosilados, cadenas pesadas, y cadenas ligeras que comprende una o más regiones hipervariables particulares (HVRs). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen actividad de ADCC mejorada con relación a anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA con relación a anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(V158) con relación a anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(F158) con relación a anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados no se unen a FGFR2IIIC.

Son proporcionados polinucleótidos que codifican para anticuerpos que se unen a FGFR2IIIb. Son proporcionados también polinucleótidos que codifican para cadenas pesadas o cadenas ligeras del anticuerpo. Son proporcionadas células anfitrionas que expresan los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados. Son proporcionados métodos de tratamiento que usan los anticuerpos afucosilados para FGFR2IIIb. Esos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento de cáncer, como el cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, y cáncer esofágico.

Los encabezados de sección usados en la presente son para propósitos organizativos únicamente y no deben ser interpretados como limitantes de la materia objeto descrita.

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo las solicitudes de patentes, publicaciones de patente, y números de acceso del GenBank se incorporan en la presente como referencia, como si cada referencia individual fuese indicada específica e individualmente como incorporada como

referencia en su totalidad.

Las técnicas y procedimientos descritos o referidos aquí son generalmente bien comprendidas y comúnmente empleadas usando la metodología convencional por aquellos expertos en la técnica, como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993); y versiones actualizadas de los mismos.

I. Definiciones

A menos que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente comprendidos por aquellos expertos en la técnica. Además, a menos que sea requerida otra cosa por el contexto o sea indicado expresamente, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán

los singulares.

Debe comprenderse que el aspecto y modalidades de la invención descritas en la presente incluyen aspectos y modalidades “que consiste de” y/o “consiste esencialmente de”. Como se usa en la presente, la forma singular “un”, “una” y “el” incluye referencias al plural a menos que se indique otra cosa.

En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o” a menos que sea establecido o comprendido expresamente por un experto en la técnica. En el contexto de una reivindicación de múltiple dependencia, el uso de “o” se refiere nuevamente a más de una reivindicación independiente o dependiente precedente.

Como es comprendido por un experto en la técnica, la referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”.

Los términos “molécula de ácido nucleico”, “ácido nucleico” y “polinucleótido” pueden ser usados de manera intercambiable, y se refieren a un polímero de nucleótidos. Esos polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, ADN, ARN, y APN. La “secuencia de ácido nucleico” se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos que comprende la molécula de ácido nucleico o polinucleótido.

Los términos “polipéptido” y “proteína” son usados de manera intercambiable para referirse a un polímero de aminoácidos residuales, y no están limitados a una longitud mínima. Esos polímeros de aminoácidos residuales pueden contener aminoácidos residuales naturales o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros, y multímeros de aminoácidos residuales. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas son abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, para propósitos de la presente invención, un “polipéptido” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, como supresiones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a la secuencia nativa, en tanto la proteína mantenga la actividad deseada. Esas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de los anfitriones que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

“FGFR2IIIb” o “FGFR2b” son usados de manera intercambiable para referirse a la forma de empalme 2 IIIb del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos. Un FGFR2IIIb humano se muestra en el No. de acceso de GenBank NP_075259.4, fechado en julio 7, 2013. Una secuencia de aminoácidos de FGFR2IIIb humano maduro ejemplar no limitante se muestra en la SEQ ID NO: 1.

“FGFR2IIIc” o “FGFR2c” son usados de manera intercambiable para referirse a la forma de empalme 2 IIIc del receptor del factor del crecimiento de los fibroblastos. Un FGFR2IIIc humano ejemplar se muestra en el No. de acceso del GenBank NP_000132.3, fechado en julio 7, 2013. Una secuencia de aminoácidos del FGFR2IIIc maduro ejemplar no limitante se muestra en la SEQ ID NO: 12.

El término “epítotope” se refiere a un sitio sobre una molécula blanco (por ejemplo, un antígeno, como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato o lípido) al cual una molécula de unión de antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína andamio) que contiene las regiones de unión de anticuerpo se une. Los epítotope con frecuencia consisten de un agrupamiento de moléculas de superficie químicamente activas como aminoácidos, polipéptidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítotope pueden ser formados por residuos contiguos o no contiguos yuxtapuestos (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares, entidades lipídicas) de la molécula blanco. Los epítotope formados de residuos contiguos (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares, entidades lipídicas) típicamente son retenidos tras la exposición a solventes desnaturizantes mientras que los epítotope formados por un pliegue terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítotope puede incluir, pero no se limita a al menos 3, al menos 5 u 8-10 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). En algunos ejemplos un epítotope es de menos de 20 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de longitud, menos de 15 residuos o menos de 12 residuos. Dos anticuerpos pueden unirse al mismo epítotope dentro de un antígeno si exhiben unión competitiva por el antígeno.

Un “epítotope no lineal” o “epítotope conformacional” comprende polipéptidos, aminoácidos y/o azúcares no contiguos dentro de la proteína antigénica a la cual un anticuerpo específico para el epítotope se une.

Un “epítotope lineal” comprende polipéptidos, aminoácidos y/o azúcares contiguos dentro de la proteína antigénica al cual un anticuerpo específico para el epítotope se une.

El término “anticuerpo” es usado en la presente en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo en tanto exhiban la actividad de unión de antígeno deseada.

El término anticuerpo incluye, pero no se limita a, fragmentos que son capaces de unirse al antígeno, como Fv, Fv de una sola cadena (scFv), Fab, Fab', y (Fab')₂. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un solo sitio de unión de antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno. El término anticuerpo también incluye, pero no se limita a, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos de varias especies como ratón, humano, mono cynomolgus, etc.

El término “región variable de cadena” se refiere a una región que comprende la cadena pesada HVR1, el marco (FR)2, HVR2, FR3 y HVR3. En algunas modalidades, una región variable de cadena pesada también comprende al menos una porción de un FR1 y/o al menos una porción de un FR4.

El término “región constante de cadena pesada” se refiere a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2, y C_H3. Las regiones constantes de cadena pesada ejemplares no limitantes incluyen γ , δ y α . Las regiones constantes de cadena ejemplares no limitantes también incluyen ϵ y μ . Cada región constante de la cadena corresponde a un isotipo del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante γ es un anticuerpo IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo IgD, y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante μ es un anticuerpo IgM, y un anticuerpo que comprende una región constante ϵ es un anticuerpo IgE. Ciertos isotipos pueden ser subdivididos además en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos IgG incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos IgG1 (que comprende una región constante γ_1), IgG2 (que comprende una región constante γ_2), IgG3 (que comprenden una región constante γ_3), y IgG4 (que comprende una región constante γ_4); los anticuerpos IgA incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos IgA1 (que comprende una región constante de α_1) y IgA2 (que comprenden una región constante α_2); y los anticuerpos IgM

incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2.

El término “cadena pesada” se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena pesada, con o sin una secuencia líder. En algunas modalidades, una cadena pesada comprende al menos una porción de una región constante de cadena pesada. El término “cadena pesada de longitud completa” se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, con o sin una secuencia líder.

El término “región variable de cadena ligera” se refiere a una región que comprende la cadena ligera HVR1, el marco (FR)2, HVR2, FR3 y HVR3. En algunas modalidades, una región variable de cadena ligera también comprende un FR1 y/o un FR4.

El término “región constante de cadena ligera” se refiere a una región que comprende un dominio constante de cadena ligera, C_L . Las regiones constantes de cadena ligera ejemplares no limitantes incluyen λ y κ .

El término “cadena ligera” se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena ligera, con o sin una secuencia líder. En algunas modalidades, una cadena ligera comprende al menos una porción de una región constante de cadena ligera. El término “cadena ligera de longitud completa” se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, con o sin una secuencia líder.

El término “región hipervariable” o “HVR” se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman lazos definidos estructuralmente (“laços hipervariables”). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVRs; tres en la V_H (H1, H2, H3), y tres en la V_L (L1, L2, L3). Las HVRs generalmente comprenden aminoácidos residuales de los laços hipervariables y/o forman las “regiones determinantes de la complementariedad” (CDRs), siendo las últimas de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento del antígeno. Los laços hipervariables ejemplares ocurren en los aminoácidos residuales 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Las CDRs ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3) ocurren en los aminoácidos residuales 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2, y 95-102 of H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

(1991)).

Los términos regiones hipervariables (HVRs) y regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), son usados en la presente de manera intercambiable con referencia a porciones de la región variable que forman la regiones de unión de antígeno.

Un "marco humano aceptor" para los propósitos de la presente es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco del dominio variable de cadena ligera (V_L) o un marco del dominio variable de cadena pesada (V_H) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define más adelante. Un marco humano aceptor derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas modalidades, el marco humano aceptor de V_L es idéntico en secuencia a la secuencia del marco de inmunoglobulina humana V_L o secuencia del marco de consenso humano.

La "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su par de unión (por ejemplo, un antígeno). En algunas modalidades, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su par Y puede ser representada generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede ser medida por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en la presente.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVRs) y/o regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), comparado con un anticuerpo original el cual no posee esas alteraciones, dando como resultado esas alteraciones en una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o ligera es derivada de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera es derivada de una fuente o especie diferente. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de una

primera especie (como ratón, rata, mono cynomolgus, etc.) y al menos una región constante de una segunda especie (como humano, mono cynomolgus, etc.). En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de ratón y al menos una región constante humana. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de cynomolgus y al menos una región constante humana. En algunas modalidades, todas las regiones variables de un anticuerpo quimérico son de una primera especie y todas las regiones constantes del anticuerpo quimérico son de una segunda especie.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el cual al menos un aminoácido en una región del marco de una región variable no humana ha sido reemplazado por el aminoácido correspondiente de una región variable humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado comprende al menos una región constante humana o fragmento de la misma. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado es un Fab, un scFv, un (Fab')₂, etc.

Un "anticuerpo injertado con HVR" se refiere a un anticuerpo humanizado en el cual una o más regiones hipervariables (HVRs) de una primera especie (no humana) han sido injertadas sobre las regiones del marco (FRs) de una segunda especie (humana).

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión del receptor de Fc; unión de C1q; CDC; ADCC; fagocitosis; de desregulación de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Esas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc sea combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y pueden ser evaluadas usando varios ensayos.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones FC humanas de secuencia nativa incluyen una región IgG1 Fc humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc IgG4 humana secuencia nativa, así como variantes naturales de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos la cual difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos.

El “receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas modalidades, un FcγR es un FcR humano nativo. En algunas modalidades, un FcR es uno el cual se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y formas desplegadas de manera alternativa de aquellos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activante”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación a base de tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor contiene un motivo de inhibición de base de tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase, por ejemplo, Dairon, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcRs son revisados, por ejemplo, en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos que sean identificados en el futuro, son abarcados por el término “FcR” en la presente.

El término “receptor de Fc” o “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Los métodos de medición de la unión a FcRn son conocidos (véase, por ejemplo, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

Las “funciones efectoras” se refieren a actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión del receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; desregulación de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

Las “células efectoras humanas” son leucocitos los cuales expresan uno o más FcRs y efectúan funciones efectoras. En ciertas modalidades, las células expresan al menos FcγRIII y efectúan funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células

mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

La “citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcRs) presentes sobre ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) permiten que esas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula blanco que contenga el antígeno y posteriormente maten a la célula blanco con citotoxinas. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII únicamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede ser efectuado un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes Estadounidenses Nos. 5,500,362 o 5.821,337 o la Patente Estadounidense No. 6,737,056 (Presta). Las células efectoras útiles para esos ensayos incluyen células PBMC y NK. De manera alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998). Los anticuerpos adicionales con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y actividad de ADCC incrementada o disminuida son descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 7,923,538, y la Patente Estadounidense No. 7,994,290.

Un anticuerpo que tiene una “actividad ADCC mejorada” se refiere a un anticuerpo que es más efectivo en la mediación de la ADCC *in vitro* o *in vivo* en comparación con el anticuerpo original, donde el anticuerpo y el anticuerpo original difieren en al menos un aspecto estructural, y cuando las cantidades de ese anticuerpo y anticuerpo original usadas en el ensayo son esencialmente las mismas. En algunas modalidades, el anticuerpo y el anticuerpo original tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero el anticuerpo está afucosilado mientras que el anticuerpo original está fucosilado. En algunas modalidades, la actividad ADCC será determinada usando el ensayo de ADCC *in vitro* como se describe en la presente, pero están contemplados otros ensayos o métodos para determinar la actividad ADCC, por ejemplo, en un modelo animal etc. En algunas modalidades, un anticuerpo con actividad de ADCC mejorada tiene afinidad mejorada por Fc

gamma RIIIA. En algunas modalidades, un anticuerpo con actividad de ADCC mejorada tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (V158). En algunas modalidades, un anticuerpo con actividad de ADCC mejorada tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (F158).

Un anticuerpo con afinidad de unión de FcR o actividad de ADCC “alterada” es uno el cual tiene actividad de unión de FcR y/o actividad de ADCC mejorada o disminuida en comparación con un anticuerpo original, donde el anticuerpo y el anticuerpo original difieren en al menos un aspecto estructural. Un anticuerpo que “presenta unión incrementada” a un FcR se une al menos a un FcR con mejor afinidad que el anticuerpo original. Un anticuerpo que “presenta unión disminuida” a un FcR, se une al menos a un FcR con menor afinidad que un anticuerpo original. Esos anticuerpos que presentan unión disminuida a un FcR pueden poseer poca o ninguna unión apreciable a un FcR, por ejemplo, unión de 0%-20% al FcR en comparación con una región Fc de IgG de secuencia nativa.

“Afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA” se refiere a un anticuerpo que tiene mayor afinidad por Fc gamma RIIIA (también referido, en algunos casos, como CD16a) que un anticuerpo original, donde el anticuerpo y el anticuerpo original difieren en al menos un aspecto estructural. En algunas modalidades, el anticuerpo y el anticuerpo original tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero el anticuerpo está afucosilado mientras que el anticuerpo original está fucosilado. Puede ser usado cualquier método adecuado para determinar la afinidad por Fc gamma RIIIA. En algunas modalidades, la afinidad por Fc gamma RIIIA es determinada por un método descrito en la presente. En algunas modalidades, un anticuerpo con afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA tiene actividad de ADCC mejorada. En algunas modalidades, un anticuerpo con afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(V158). En algunas modalidades, un anticuerpo con afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(F158).

Un anticuerpo “afucosilado” o un anticuerpo “que carece de fucosa” se refieren a un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 y carece de fucosa en su glicosilación de la región constante. La glicosilación de IgG1 o IgG3 humana ocurre en Asn297 como una glicosilación oligosacárida compleja biantenaria fucosilada central terminada con hasta 2 residuos de Gal. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado carece de fucosa en Asn297. Esas estructuras son designadas como G0, G1 (α 1,6 o α 1,3) o residuos de glicano G2, dependiendo de la cantidad de residuos de Gal terminal. Véase, por ejemplo,

Raju, T. S., *BioProcess Int.* 1: 44-53 (2003). La glicosilación tipo CHO del Fc del anticuerpo es descrita, *por ejemplo*, en Routier, F. H., *Glycoconjugate J.* 14: 201-207 (1997). En algunas modalidades, al menos 85% de un lote de anticuerpos expresados de manera recombinante en células anfitrionas CHO no glicomodificadas están fucosilados en Asn297. Cuando se hace referencia a una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos, se considera que los anticuerpos estarán afucosilados si <5% de los anticuerpos en la composición comprenden fucosa en Asn297. Los métodos de medición de fucosa incluyen cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, la fucosa es detectada por el método descrito en el Ejemplo 1. En algunas modalidades, la fucosa es indetectable en una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos afucosilados. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado tiene actividad de ADCC mejorada. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(V158). En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(F158).

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula blanco en presencia de complemento. La activación de la vía clásica del complemento es iniciada por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), los cuales se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede ser efectuado un ensayo de CDC, *por ejemplo*, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Los anticuerpos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y la capacidad de unión de C1q incrementada o disminuida son descritos, *por ejemplo*, en la Patente Estadounidense No. 6,194,551 B1, Patente Estadounidense No. 7,923,538, Patente Estadounidense No. 7,994,290 y WO 1999/51642. Véase también, *por ejemplo*, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

El término “sustancialmente similar” o “sustancialmente el mismo,” como se usa aquí, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos o más valores numéricos de modo que un experto en la técnica considere la diferencia entre dos o más valores de poco o ningún significado biológico y/o estadístico dentro del contexto de la característica biológica medida por el valor. En algunas modalidades dos o más valores sustancialmente similares difieren en

no más de aproximadamente cualquiera de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, o 50%.

La frase “sustancialmente reducido,” o “sustancialmente diferente,” como se usa en la presente, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos de modo que un experto en la técnica considera la diferencia entre los dos valores de significado estadístico dentro del contexto de la característica biológica medida por los valores. En algunas modalidades, dos valores numéricos sustancialmente diferentes difieren en más de aproximadamente cualquiera de 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%.

Los términos “secuencia líder” y “secuencia señal” son usados de manera intercambiable para referirse a una secuencia de aminoácidos residuales localizada en el N terminal de un polipéptido que facilita la secreción de un polipéptido de una célula de mamífero. Una secuencia líder puede ser escindida tras la exportación del polipéptido de la célula de mamífero, formando una proteína madura. Las secuencias líder pueden ser naturales o sintéticas, y pueden ser heterólogas u homólogas a la proteína a la cual se encuentran unidas.

Un polipéptido de “secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido encontrado en la naturaleza. De este modo, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural de cualquier mamífero. Ese polipéptido de secuencia nativa puede ser aislado de la naturaleza o puede ser producido por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de “secuencia nativa” abarca específicamente formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido (*por ejemplo*, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (*por ejemplo*, formas empalmadas de manera alternativa) y variantes alélicas naturales del polipéptido.

Una “variante” polipeptídica significa un polipéptido biológicamente activo que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el por ciento de identidad de secuencia máximo, y sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Esas variantes incluyen, *por ejemplo*, polipéptidos donde uno o más aminoácidos residuales, son agregados, o suprimidos, en el N-terminal o C-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos. En alguna modalidad, una variante tendrá al menos

aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

Como se usa en la presente, “por ciento (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos” y “homología” con respecto a una secuencia de péptido, polipéptido o anticuerpo se definen como el porcentaje de aminoácidos residuales en la secuencia candidata que son idénticos con los aminoácidos residuales en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el por ciento de identidad de la secuencia máximo, y sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia de aminoácidos. La alineación para propósitos de determinación del por ciento de identidad de la secuencia de aminoácidos puede ser lograda de varias maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software de computadora disponible al público como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que estén siendo comparadas.

Una sustitución de aminoácido puede incluir pero no se limita al reemplazo de un aminoácido en un polipéptido con otro aminoácido. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de “sustituciones preferidas”. Los cambios más sustanciales se proporcionan en la Tabla 1 bajo el encabezado de “sustituciones ejemplares”, y como se describe mejor más adelante con referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácido. Las sustituciones de aminoácido pueden ser introducidas en un anticuerpo de interés y los productos seleccionados para una actividad deseada, *por ejemplo*, unión de antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 1

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo a propiedades de cadena lateral como:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;

- (5) residuos que tienen influencia sobre orientación de la cadena: Gly, Pro;**
(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un miembro de una de esas clases por otra clase.

El término “vector” es usado para describir un polinucleótido que puede ser modificado para contener un polinucleótido o polinucleótidos clonados que puedan propagarse en una célula anfitriona. Un vector puede incluir uno o más de los siguientes elementos: un origen de replicación, una o más secuencias reguladoras (como, por ejemplo, promotores y/o mejoradores) que regulen la expresión del polipéptido de interés, y/o uno o más genes o marcadores seleccionables (como, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos y genes que puedan ser usados en ensayos colorimétricos, *por ejemplo*, β -galactosidasa). El término “vector de expresión” se refiere a un vector que es usado para expresar un polipéptido de interés en una célula anfitriona.

Una “célula anfitriona” se refiere a una célula que puede ser o ha sido receptora de un vector o polinucleótido aislado. Las células anfitrionas pueden ser células procarióticas o células eucarióticas. Las células eucarióticas ejemplares incluyen célula de mamífero, como células de primate o animales no primates; células micóticas, como levaduras; células de planta; y células de insecto. Las células de mamíferos ejemplares no limitantes incluyen, pero no se limitan a, células NSO, células PER.C6® (Crucell), y células 293 y CHO, y sus derivados, como células 293-6E y DG44, respectivamente.

El término “aislada” se refiere a una molécula que ha sido separada de al menos alguno de los componentes con los cuales se encuentra típicamente en la naturaleza o es producida. Por ejemplo, un polipéptido es referido como “aislado” cuando es separado al menos de alguno de los componentes de la célula con los cuales fue producido. Donde un polipéptido es secretado por una célula después de la expresión, la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que produjo éste, se considera el “aislamiento” del polipéptido. De manera similar, un polinucleótido es referido como “aislado” cuando éste no es parte del polinucleótido más grande (como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en el cual típicamente se encuentra en la naturaleza, o es separado de al menos algunos de los componentes de la célula en la cual se produjo, *por ejemplo*, en el caso de un polinucleótido de ARN. De este modo, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula anfitriona puede ser referido como

“aislado”.

Los términos “individuo” o “sujeto” son usados de manera intercambiable en la presente para referirse a un animal; por ejemplo un mamífero. En algunas modalidades, son proporcionados métodos de tratamiento de animales, incluyendo, pero sin limitarse a, humanos, roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales mamíferos de laboratorio, animales mamíferos de granja, animales mamíferos para deportes, y mascotas mamíferas. En algunos ejemplos, un “individuo” o “sujeto” se refiere a un individuo o sujeto que necesite del tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Una “enfermedad” o “trastorno” se refiere a una condición donde es necesario el tratamiento.

El término “cáncer” se refiere a un trastorno proliferativo maligno asociado con proliferación celular descontrolada, crecimiento celular irrestricto, muerte celular disminuida vía apoptosis. Los cánceres ejemplares no limitantes incluyen cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, y cáncer esofágico. En algunas modalidades, un cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, amplificación de FGFR2 comprende una relación de FGFR2:CEN10 (centrómero del cromosoma 10) de >3 . En algunas modalidades, un cáncer que comprende una amplificación del gen de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es mayor de 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de la expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En algunas modalidades, un cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende la amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, un cáncer gástrico comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, un cáncer gástrico que comprende una amplificación del gen de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer gástrico que comprende la amplificación de FGFR2 sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer gástrico que comprende la amplificación de FGFR2 expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es más de 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En

algunas modalidades, un cáncer gástrico sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende la amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la sobreexpresión es la sobreexpresión de ARNm. En algunas modalidades, la sobreexpresión es la sobreexpresión de proteína.

El término "tumor" es usado aquí para referirse a un grupo de células que exhiben niveles anormalmente altos de proliferación y crecimiento. Un tumor puede ser benigno, premaligno, o maligno; las células tumorales malignas son cancerosas. Las células tumorales pueden ser células tumorales sólidas o células tumorales leucémicas. El término "crecimiento tumoral" se usa aquí para referirse a la proliferación o crecimiento por una célula o células que comprende un tumor que conduce a un incremento correspondiente en el tamaño del tumor.

Como se usa aquí, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos benéficos o deseados. "Tratamiento" como es usado en la presente, cubre cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para una enfermedad en un mamífero, incluyendo un humano. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de uno o más de: alivio de uno o más síntomas, disminución del grado de enfermedad, prevención o retraso de la propagación (*por ejemplo*, metástasis, *por ejemplo* metástasis hacia el pulmón o hacia los nodos linfáticos) de la enfermedad, prevención o retraso de la recurrencia de la enfermedad, retraso o disminución del progreso de la enfermedad, alivio del estado de enfermedad, inhibición de la enfermedad o progreso de la enfermedad, inhibición o detención de la enfermedad o su progreso, tensión de su desarrollo, y remisión (ya sea parcial o total). También, abarcada por "tratamiento" es una reducción de la consecuencia patológica de una enfermedad proliferativa. Los métodos de la invención contemplan cualquiera o más de esos aspectos del tratamiento.

En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de: inhibición del crecimiento de células tumorales o células cancerosas, inhibición de la replicación de células tumorales o células cancerosas, disminución de la carga tumoral total y alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

Los términos "inhibición" o "inhibir" se refieren a una disminución o cese de cualquier característica fenotípica o la disminución o cese en la incidencia, grado, o probabilidad de esa característica. "Reducido" o "inhibir" es hacer disminuir, reducir o detener una actividad, función y/o cantidad en comparación

con una referencia. En ciertas modalidades, “reducir” o “inhibir” significa la capacidad de causar una disminución total del 20% o mayor. En otra modalidad, “reducir” o “inhibir” significa la capacidad de causar una disminución total del 50% o mayor. En otra modalidad, “reducir” o “inhibir” significa la capacidad de causar una disminución total del 75%, 85%, 90%, 95%, o mayor.

Una “referencia” como se usa en la presente, se refiere a cualquier muestra, estándar, o nivel que sea usado para propósitos de comparación., Una referencia puede ser obtenida de una muestra sana y/o sin enfermedad. En algunas modalidades, una referencia puede ser obtenida de una muestra sin tratar. En algunos ejemplos, una referencia es obtenida de una muestra sin enfermedad y sin tratar de un sujeto individual. En algunos ejemplos, una referencia es obtenida de uno o más individuos sanos que no sean el sujeto o paciente.

Como se usa en la presente, “retraso del desarrollo de una enfermedad” significa diferir, obstaculizar, detener, retardar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo del estudio de la enfermedad y/o del individuo que sea tratado. Como es obvio a un experto en la técnica, un retraso suficiente significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, dado que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en etapa final, como el desarrollo de metástasis, puede ser retardado.

“Prevenir,” como se usa en la presente, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad.

Como se usa en la presente, “suprimir” una función o actividad es reducir la función o actividad cuando se compara con condiciones en otras circunstancias similares excepto por una condición o parámetro de interés, o de manera alternativa, en comparación con otra condición. Por ejemplo, un anticuerpo que suprime el crecimiento del tumor reduce la velocidad de crecimiento del tumor comparada con la velocidad de crecimiento del tumor en ausencia del anticuerpo.

Una “cantidad efectiva” de un agente se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de una sustancia/molécula

de la invención, agonista o antagonista puede variar dependiendo de factores como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquier efecto tóxico o dañino de la sustancia/molécula, agonista o antagonista es superado por los efectos terapéuticamente benéficos. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser proporcionada en una o más administraciones.

Una “cantidad profilácticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, puesto que una dosis profiláctica es usada en sujetos antes de o en una etapa inicial de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los términos “formulación farmacéutica” y “composición farmacéutica” se refieren a una preparación la cual está en una forma tal que permite que la actividad biológica de los ingredientes sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos a un sujeto al cual la formulación sería administrada. Esas formulaciones pueden ser estériles.

Un “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material encapsulante, auxiliar de formulación o portador convencional no tóxicos en la técnica para usarse con un agente terapéutico que juntos comprendan una “composición farmacéutica” para la administración a un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable no es tóxico a los receptores a las dosis y concentraciones empleadas si es compatible con otros ingredientes de la formulación. El portador farmacéuticamente aceptable es apropiado para la formulación empleada.

Una formulación “estéril” es aséptica o está esencialmente libre de microorganismos vivos y sus esporas.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva o secuencial en cualquier orden.

El término “concurrentemente” es usado en la presente para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se superpone en el tiempo o donde la administración de un agente terapéutico cae dentro de un periodo corto de tiempo con relación a la

administración del otro agente terapéutico. Por ejemplo, dos o más agentes terapéuticos son administrados con una separación de tiempo de no más de aproximadamente 60 minutos, como no más de aproximadamente cualquiera de 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos, o 1 minuto.

El término “secuencialmente” es usado en la presente para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos donde la administración de uno o más agentes continúa después de discontinuar la administración de uno o más otros agentes. Por ejemplo, la administración de dos o más agentes terapéuticos es efectuada con una separación de tiempo mayor de aproximadamente 15 minutos, como aproximadamente cualquiera de 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, o 60 minutos, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o 1 mes o más.

Como se usa en la presente, “en conjunto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento, además de otra modalidad de tratamiento. Por lo tanto, “en conjunto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

El término “inserto de paquete” es usado para referirse a las instrucciones comúnmente incluidas en paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contiene información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias relacionadas con el uso de esos productos terapéuticos.

Un “artículo de manufactura” es cualquier manufactura (por ejemplo, un paquete o recipiente) o equipo que comprenda al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), o una sonda para detectar específicamente un marcador biológico descrito aquí. En ciertas modalidades, la manufactura o equipo es promovida, distribuida o vendida como una unidad para efectuar los métodos descritos aquí.

II. Anticuerpos Anti-FGFR2IIIb

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo afucosilado dirigido contra FGFR2IIIb. Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de ratón, y anticuerpos que comprenden las HVRs de cadena pesada y/o ligera (por ejemplo, CDRs) discutidas en la presente. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos afucosilados aislados que se unen a

FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado modula la actividad de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado tiene actividad de ADCC mejorada. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (V158). En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (F158).

El anticuerpo anti-FGFR2IIIb designado "αFGFR2b" descrito en la presente en los Ejemplos y el listado de secuencias pretende tener la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo HuGAL-FR21 en la Patente Estadounidense No. 8,101,723 B2, expedida en enero 24, 2012. La Patente Estadounidense No. 8,101,723 B2 es incorporada específicamente aquí como referencia para cualquier propósito, y, en particular, las Figuras 13 y 14 de la Patente Estadounidense No. 8,101,723 B2, la cual muestra las secuencias de aminoácidos de regiones variables y cadenas de anticuerpo maduras de longitud completa de HuGAL-FR21, son incorporadas aquí como referencia para cualquier propósito. Además, las secuencias de HVR del anticuerpo HuGAL-FR21, las cuales se encuentran subrayadas en la Figura 13 de la Patente Estadounidense No. 8,101,723 B2, son incorporadas específicamente aquí como referencia para cualquier propósito.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVRs (por ejemplo, CDRs) seleccionadas de entre (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende al menos una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada y al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y al menos una cadena ligera que comprende una región variable

de cadena ligera y al menos una porción de una región constante de cadena ligera. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende dos cadenas pesadas, donde cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y dos cadenas ligeras, donde cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y al menos una porción de una región constante de cadena ligera. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que comprende seis HVRs que comprenden (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende las seis HVRs como se describió anteriormente y se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que comprende las seis HVRs como se describió anteriormente, se une a FGFR2IIIb y tiene al menos una actividad seleccionada de actividad de ADCC mejorada y afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (como Fc gamma RIIIA (V158) y/o Fc gamma RIIIA (F158)). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado no se une a FGFR2IIIc.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que compite con un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende seis HVRs que comprenden (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo afucosilado que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo afucosilado que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, un anticuerpo afucosilado de la invención comprende (a) un dominio de V_H que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 8; y (b) un dominio de V_L que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En ciertas modalidades, una secuencia de V_H que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, han sido sustituidos,

insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 4. En ciertas modalidades, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en la región fuera de las HVRs (*es decir*, en los FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende la secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 5, incluyendo modificaciones postraslacionales de esa secuencia. En una modalidad particular, una V_H comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En ciertas modalidades, una secuencia de V_L que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 5. En ciertas modalidades, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en la región fuera de las HVRs (*es decir*, en los FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de V_L en SEQ ID NO: 4, incluyendo modificaciones postraslacionales de esa secuencia. En una modalidad particular, una V_L comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En ciertas modalidades, una secuencia de V_H que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, y una secuencia de V_L que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 4. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 5. En ciertas modalidades, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en la región fuera de las HVRs (*es decir*, en los FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de V_H en la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 5, incluyendo modificaciones postraslacionales de una o ambas secuencias. En una modalidad particular, una V_H comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; y una V_L comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado, donde el anticuerpo comprende una V_H como en cualquiera de las modalidades proporcionadas anteriormente, y una V_L como en cualquiera de las modalidades proporcionadas anteriormente. En una modalidad, el anticuerpo comprende una de las secuencias de V_H y V_L de la SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente, incluyendo modificaciones postraslacionales de aquellas secuencias.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de cadena pesada que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, una secuencia de cadena pesada que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en la región fuera de las HVRs (*es decir*, en los FRs). Opcionalmente, la cadena pesada del anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de V_H en la SEQ ID NO: 2, incluyendo modificaciones postraslacionales de esa secuencia. En una modalidad particular, la cadena pesada comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado, donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En ciertas modalidades, una secuencia de cadena ligera que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 3. En ciertas modalidades, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en la región fuera de las HVRs (*es decir*, en los FRs). Opcionalmente, la cadena ligera del anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de V_L en la SEQ ID NO: 3, incluyendo modificaciones postraslacionales de esa secuencia. En una modalidad particular, la cadena ligera comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de cadena pesada que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de cadena ligera que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En ciertas modalidades, una secuencia de cadena pesada que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, una secuencia de cadena ligera que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR2IIIb que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FGFR2IIIb. En ciertas modalidades, ese anticuerpo anti-FGFR2IIIb retiene la capacidad de unirse selectivamente a FGFR2IIIb sin unirse a FGFR2IIIc. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 3. En ciertas modalidades, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en la región fuera de las HVRs (*es decir*, en los FRs). Opcionalmente, la cadena pesada del anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de V_H en la SEQ ID NO: 2, incluyendo modificaciones postraslacionales de esa secuencia y la cadena ligera del anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado comprende una secuencia de V_L en la SEQ ID NO: 3, incluyendo modificaciones postraslacionales de esa secuencia. En una modalidad particular, la cadena pesada comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; y la cadena ligera comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

Anticuerpos quiméricos ejemplares

En ciertas modalidades, un anticuerpo, como un anticuerpo afucosilado, proporcionado en la presente es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos son descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 4,816,567; y Morrison *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo más, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “de clase cambiada” en el cual la clase o subclase ha sido modificada de las del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Los anticuerpos quiméricos afucosilados ejemplares no limitantes incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden las secuencias de cadena pesada de HVR1, HVR2, y HVR3, y/o cadena ligera HVR1, HVR2, HVR3 descritas en la presente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico afucosilado comprende las regiones variables descritas anteriormente y se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico afucosilado que comprende las regiones variables descritas anteriormente, se une a FGFR2IIIb y tiene al menos una actividad seleccionada de actividad de ADCC mejorada y afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (como Fc gamma RIIIA (V158) y/o Fc gamma RIIIA (F158)). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico afucosilado no se une a FGFR2IIIc.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico afucosilado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4, donde el anticuerpo se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico afucosilado comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95 %, al menos 96%, al menos 97%, al

menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 5, donde el anticuerpo se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico afucosilado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95 %, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4; y una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 5; donde el anticuerpo se une a FGFR2IIIb.

Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb quiméricos afucosilados ejemplares también incluyen anticuerpos quiméricos que compiten por la unión a FGFR2IIIb con un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en la presente. De este modo, en algunas modalidades, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico que compite por la unión a FGFR2IIIb con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, el anticuerpo compite por la unión a FGFR2IIIb, pero no se une a FGFR2IIIc.

En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico descrito aquí comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de entre IgA, IgG, e IgD. En algunas modalidades, la región constante de cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico descrito aquí comprende una región constante de IgG humana. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico descrito aquí comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico descrito aquí comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

Como se hizo notar anteriormente, si o no la función efectora es deseable puede depender del método particular de tratamiento pretendido para un anticuerpo. De este modo, en algunas modalidades, cuando es deseable la función efectora, es seleccionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana. En algunas modalidades,

cuando la función efectora no es deseable, es seleccionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb quimérico que comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humana.

Anticuerpos humanizados ejemplares

En algunas modalidades, son proporcionados anticuerpos humanizados afucosilados que se unen FGFR2IIIb. Los anticuerpos humanizados son útiles como moléculas terapéuticas debido a que los anticuerpos humanizados reducen o eliminan la respuesta inmune humana a anticuerpos no humanos (como la respuesta al anticuerpo antirratón de humano (HAMA)), lo cual puede dar como resultado una respuesta inmune a un anticuerpo terapéutico, y efectividad disminuida del agente terapéutico.

En ciertas modalidades, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a humanos, reteniendo a la vez la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los cuales las HVRs, por ejemplo, CDRs, (o porciones de las mismas) son derivadas de un anticuerpo no humano, y los FRs (o porciones de los mismos) son derivados de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado son sustituidos con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual se derivaron los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para producirlos son revisados, por ejemplo, en Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633, y se describen además, *por ejemplo en* Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-329; Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; Patentes Estadounidenses Nos. 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, y 7,087,409; Kashmiri *et al.*, (2005) *Methods* 36:25-34 (que describe injertar SDR (a-CDR)); Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (que describe "reformat"); Dall'Acqua *et al.*, (2005) *Methods* 36:43-60 (que describe "la concentración de FR"); y Osbourn *et al.*, (2005) *Methods* 36:61-68 and Klimka *et al.*, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (que describe el enfoque de "selección guiada" para la conservación de FR).

Las regiones del marco humanas que pueden ser usadas para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones de marco seleccionadas

usando el método del “mejor ajuste” (véase, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296); las regiones del marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; y Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2623); regiones de marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones de marco de línea germinal humanas (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); y regiones de marco derivadas de la selección de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 y Rosok *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618).

Los anticuerpos humanizados ejemplares no limitantes incluyen α FGFR2b, descritos en la presente. Los anticuerpos humanizados afucosilados ejemplares no limitantes incluyen α FGFR2bA, descritos en la presente, los cuales tienen las mismas secuencias de aminoácidos que el α FGFR2b que comprende fucosa (también referido como α FGFR2bF). Los anticuerpos humanizados afucosilados ejemplares no limitantes también incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada del α FGFR2b y/o una región variable de cadena ligera del α FGFR2b. Los anticuerpos humanizados afucosilados ejemplares no limitantes incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 4 y/o una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5. Los anticuerpos humanizados ejemplares también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados que comprende las cadenas pesadas HVR1, HVR2, y HVR3, y/o cadenas ligeras HVR1, HVR2, y HVR3 del α FGFR2b. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado comprende las HVRs descritas anteriormente (es decir, (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11) y se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado comprende las HVRs descritas anteriormente, se une a FGFR2IIIb y tiene al menos una actividad seleccionada de actividad de ADCC mejorada y afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (como el Fc gamma RIIIA(V158) y/o Fc gamma RIIIA(F158)). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFRIIIb

humanizado fucosilado no se une a FGFR2IIIc.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende cadenas pesadas HVR1, HVR2, y HVR3 y/o cadenas ligeras HVR1, HVR2, y HVR3 of α FGFR2b. Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb humanizados afucosilados ejemplares no limitantes incluyen anticuerpos que comprenden los conjuntos de cadenas pesadas HVR1, HVR2, y HVR3 expuestas en las SEQ ID NOs: 6, 7, y 8. Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb humanizados afucosilados ejemplares no limitantes también incluyen anticuerpos que comprenden los conjuntos de cadenas ligeras HVR1, HVR2, y HVR3 expuestas en las SEQ ID NOs: 9, 10, y 11.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4, y donde el anticuerpo se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 5, donde el anticuerpo se une a FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4; y una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 5; donde el anticuerpo se une a FGFR2IIIb.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende al menos una de las HVRs discutidas aquí. Eso es, en algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende al menos una HVR seleccionada de una cadena pesada HVR1 discutida aquí, una cadena pesada HVR2 discutida aquí, una cadena pesada HVR3 discutida aquí, una cadena ligera HVR1 discutida aquí, una cadena ligera HVR2 discutida aquí, y una cadena ligera HVR3 discutida aquí. Además, en

algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende al menos una HVR mutante sobre la base de una HVR discutida aquí, donde la HVR mutante comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido con relación a la HVR discutida aquí. En algunas modalidades, una o más de las sustituciones de aminoácido son sustituciones de aminoácido conservadoras. Un experto en la técnica puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácido conservadoras adecuadas para una secuencia de HVR particular, donde se estima que las sustituciones de aminoácido conservadoras adecuadas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo que comprende la HVR mutante.

Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb humanizados afucosilado ejemplares también incluyen anticuerpos que compiten por la unión a FGFR2IIIb con un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en la presente. De este modo, en algunas modalidades, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado que compite por la unión a FGFR2IIIb con α FGFR2b. En algunas modalidades, es proporcionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado que compite por la unión a FGFR2IIIb con α FGFR2b y que tiene al menos una actividad seleccionada de actividad de ADCC mejorada y afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (como Fc gamma RIIIA(V158) y/o Fc gamma RIIIA(F158)). En algunas modalidades, el anti-FGFR2IIIb anticuerpo humanizado afucosilado no se une a FGFR2IIIC.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG, e IgD. En algunas modalidades, la región constante de cadena ligera humana es un isotipo seleccionado de κ y λ .

En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado afucosilado descrito aquí comprende una región constante de IgG humana. En algunas modalidades, cuando es deseable la función efectora, es seleccionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado afucosilado que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado afucosilado descrito aquí comprende una región constante de IgG1 humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado afucosilado descrito aquí comprende una región constante de IgG1 humana, donde N297 no está fucosilado. En algunas modalidades, un anticuerpo humano afucosilado descrito

aquí comprende una región constante de IgG1 humana y una cadena ligera κ humana.

En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado afucosilado comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado afucosilado comprende una cadena pesada que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y cualquier modificación postranslacional, y una cadena ligera que consiste la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y cualquier modificación postranslacional.

Región Constante de Anticuerpo Ejemplares

En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado descrito aquí comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG, e IgD. En algunas modalidades, la región constante de cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ .

En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado descrito en la presente comprende una región constante de IgG humana. En algunas modalidades, cuando es deseable la función efectora, es seleccionado un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado descrito aquí comprende región constante de IgG1 humana. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado descrito aquí comprende una región constante de IgG1 humana, donde N297 no está fucosilado. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado descrito aquí comprende una región constante de IgG1 humana y una cadena ligera κ humana.

A través de la presente especificación y las reivindicaciones a menos que sea establecido o conocido explícitamente por un experto en la técnica, la numeración de esos residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), incorporada expresamente aquí como referencia. El “índice EU como en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano.

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención comprende una región Fc variante que tiene al menos una sustitución de aminoácido

comparada con la Región Fc de un IgG natural o un anticuerpo natural. En ciertas modalidades, la región Fc variante tiene dos o más sustituciones de aminoácido en la Región Fc del anticuerpo natural. En ciertas modalidades, la región Fc variante tiene tres o más sustituciones de aminoácido en la Región Fc del anticuerpo natural. En ciertas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una, dos o tres o más sustituciones de aminoácidos de las Regiones Fc descritas en la presente. En ciertas modalidades, la región Fc variante de la presente poseerá al menos aproximadamente 80% de homología con una Región Fc de secuencia nativa y/o con una Región Fc de un anticuerpo original. En ciertas modalidades, la región Fc variante de la presente poseerá al menos aproximadamente 90% de homología con una Región Fc de secuencia nativa y/o con una Región Fc de un anticuerpo original. En ciertas modalidades, la región Fc variante poseerá al menos aproximadamente 95% de homología con una Región Fc de secuencia nativa y/o con una Región Fc de un anticuerpo original.

En ciertas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es alterado para incrementar o hacer disminuir un grado en el cual el anticuerpo fue glicosilado. La adición o supresión de sitios de glicosilación para un anticuerpo puede ser lograda convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de modo que sea creado o removido uno o más sitios de glicosilación.

Donde el anticuerpo comprende una Región Fc, el carbohidrato unido a éste puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico que generalmente es unido por un enlace de N al Asn297 del dominio CH2 de la Región Fc. Véase, *por ejemplo*, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, *por ejemplo*, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como una fucosa unida a GlcNAc en el “tallo” de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden ser efectuadas para crear anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una modalidad, son proporcionados anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una Región Fc (es decir, anticuerpos afucosilados). Por ejemplo, la cantidad de fucosa en una composición que comprende una pluralidad de esos anticuerpos puede ser de 0% hasta aproximadamente 5%. En algunas modalidades, una composición que comprende una pluralidad de esos anticuerpos comprende al

menos 95% de anticuerpos afucosilados. La cantidad de fucosa es determinada calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en la Asn297, con relación a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (*por ejemplo*, estructuras de manosa complejas, híbridas y superiores). Los métodos ejemplares no limitantes de detección de fucosa en un anticuerpo incluyen espectrometría de masas MALDI-TOF (*véase, por ejemplo*, la WO 2008/077546), medición por HPLC de los oligosacáridos marcados de manera fluorescente liberados (*véase, por ejemplo*, Schneider et al., "N-Glycan analysis of monoclonal antibodies and other glycoproteins using UHPLC with fluorescence detection," Agilent Technologies, Inc. (2012); Lines, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 14: 601-608 (1996); Takahasi, *J. Chrom.*, 720: 217-225 (1996)), medición por electroforesis capilar de los oligosacáridos marcados de manera fluorescente liberados (*véase, por ejemplo*, Ma et al., *Anal. Chem.*, 71: 5185-5192 (1999)), y HPLC con detección amperométrica pulsátil para medir la composición del monosacárido (*véase, por ejemplo*, Hardy, et al., *Analytical Biochem.*, 170: 54-62 (1988)). Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la Región Fc (numeración EU de los residuos de la Región Fc); sin embargo, el Asn297 también puede localizarse aproximadamente ± 3 aminoácidos hacia adelante o hacia atrás de la posición 297, *es decir*, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. En el anticuerpo α FGFR2b descrito aquí, Asn297 se encuentra en la secuencia QY**N**ST, y se encuentra en negritas y subrayada en la Tabla de Secuencias mostrada más adelante, SEQ ID NO: 2. Las variantes de fucosilación pueden tener función de ADCC mejorada. Véase, *por ejemplo*, las Publicaciones de Patentes Estadounidenses Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "afucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos afucosilados incluyen células de CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente Estadounidense No. US 2003/0157108

A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares modificadas, como líneas celulares que carecen de un gen alfa-1,6-fucosiltransferasa funcional, FUT8, *por ejemplo*, células CHO modificadas (véase, *por ejemplo*, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

Se proporcionan además anticuerpos con oligosacáridos bisectados, *por ejemplo*, en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a la Región Fc del anticuerpo es bisectado por GlcNAc. Esos anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Los Ejemplos de esos anticuerpos son descritos, *por ejemplo*, en la WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); Patente Estadounidense No. 6,602,684 (Umana *et al.*); y US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Se proporcionan anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la Región Fc. Esos anticuerpos pueden tener función de CDC mejorada. Esos anticuerpos son descritos, *por ejemplo*, en la WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y la WO 1999/22764 (Raju, S.).

También se proporcionan anticuerpos con extensiones líder amino-terminal. Por ejemplo, uno o más aminoácidos residuales de la secuencia líder amino-terminal están presentes en el amino-terminal de cualquiera de una o más cadenas pesada o ligera de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal ejemplar comprende o consiste de tres aminoácidos residuales, VHS, presentes sobre una o ambas cadenas ligeras de un anticuerpo.

La vida media *in vivo* o suero de los polipéptidos de unión de alta afinidad FcRn humanos puede ser ensayada, *por ejemplo*, en ratones transgénicos, en humanos, o en primates no humanos a los cuales sean administrados los polipéptidos con una región Fc variante. Véase también, *por ejemplo*, Petkova *et al. International Immunology* 18(12):1759-1769 (2006).

En algunas modalidades de la invención, un anticuerpo afucosilado media la ADCC en presencia de células efectoras humanas más efectivamente que un anticuerpo original que comprende fucosa. Generalmente, la actividad de ADCC puede ser determinada usando el ensayo de ADCC *in vitro* como se describe en la presente, pero se contemplaron otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, *por ejemplo* en un modelo animal, *etc.*

En ciertas modalidades, el "K_D," "K_d," "Kd" o "valor de Kd" de anticuerpo es medido usando ensayos de resonancia plasmónica superficial usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway,

N.J.) a 25 °C con microcircuitos CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). De manera breve, los microcircuitos biodetectores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) son activados con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El antígeno es diluido con acetato de sodio a 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/mL (~0.2 µM) antes de inyectar a una velocidad de flujo de 5 µL/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta metanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, son inyectadas diluciones en serie de polipéptido, *por ejemplo*, anticuerpo de longitud completa en PBS con tensoactivo TWEEN-20™ (PBST) al 0.05% a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µL/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) son calculadas usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación al equilibrio (K_d) es calculada como la relación de k_{off}/k_{on} . Véase, *por ejemplo*, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia plasmónica superficial anterior, entonces puede ser determinada una velocidad de asociación usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295 nm; emisión=340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno de acuerdo a lo medido en un espectrómetro como un espectrómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ 8000-series (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

Una “velocidad de asociación”, o “ k_{on} ” del anticuerpo también puede ser determinada como se describió anteriormente usando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

En ciertas modalidades, la diferencia entre los dos valores (por ejemplo, valores de K_d) es sustancialmente la misma, por ejemplo, menor de aproximadamente 50%, menor de aproximadamente 40%, menor de aproximadamente 30%, menor de aproximadamente 20%, y/o menor de aproximadamente 10% como función del valor de referencia/comparador.

En ciertas modalidades, la diferencia entre los dos valores (por

ejemplo, valores de K_d) es sustancialmente diferente, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10%, mayor de aproximadamente 20%, mayor de aproximadamente 30%, mayor de aproximadamente 40%, y/o mayor de aproximadamente 50% como función del valor de la molécula de referencia/comparador.

Secuencias Líder Ejemplares

Para que algunas proteínas secretadas se expresen y se incrementen en grandes cantidades, puede ser deseable una secuencia líder de una proteína heteróloga. En algunas modalidades, el empleo de secuencias líder heterólogas puede ser ventajoso dado que un polipéptido maduro resultante puede permanecer sin alterarse cuando la secuencia líder sea removida en el ER durante el proceso de secreción. Puede requerirse la adición de una secuencia líder heteróloga para expresar y secretar algunas proteínas.

Ciertas secuencias líder ejemplares son descritas, por ejemplo, en la Base de Datos de Secuencia Líder en línea mantenida por el Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional de Singapur. Véase Choo *et al*, *BMC Bioinformatics*, 6: 249(2005); y Publicación PCT No. WO 2006/081430.

III. Propiedades de los Anticuerpos Anti-FGFR2IIIb Afucosilados

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen actividad de ADCC mejorada *in vitro* y/o *in vivo*. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen actividad de ADCC mejorada *in vitro*. En algunas modalidades, la actividad de ADCC *in vitro* es determinada por un método descrito en la presente, por ejemplo, en el Ejemplo 3. De manera breve, las células que expresan FGFR2IIIb son puestas en contacto con PBMCs humanas recién aisladas a una relación de efector 25:1 (PBMCs) a células blanco, en la presencia de un anticuerpo fucosilado o un anticuerpo afucosilado. En algunas modalidades, son usadas células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb como células blanco. En algunas modalidades, la citotoxicidad es determinada cuantificando la liberación de LDH usando el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox (Promega, Madison, WI). En algunas modalidades, la lisis máxima es determinada usando Tritón X-100 al 5% y la liberación espontánea es determinada en ausencia de anticuerpo. En algunas modalidades, el porcentaje de lisis específica puede ser determinado usando la fórmula: $(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}) \times 100 = \% \text{ de lisis específica}$. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que tiene actividad de ADCC mejorada da como resultado en la lisis específica

que es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 65, al menos 70, o al menos 75 puntos porcentuales que la lisis específica con la misma cantidad de un anticuerpo fucosilado, a al menos una concentración de anticuerpo probada. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado que tiene actividad de ADCC mejorada da como resultado en la lisis específica que es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 65, al menos 70, o al menos 75 puntos porcentuales mayor que la lisis específica con un anticuerpo fucosilado, donde cada anticuerpo se encuentra a una concentración de entre 0.01 µg/mL y 1 µg/mL y la células blanco son células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb. En algunas modalidades, los anticuerpos son probados a una concentración de 0.01 µg/mL, 0.1 µg/mL, o 1 µg/mL.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (V158). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (F158). En algunas modalidades, la afinidad del anticuerpo por Fc gamma RIIIA es determinada usando resonancia plasmódica superficial, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2, y/o como sigue, lo cual es descrito con referencia al Fc gamma RIIIA (V158), pero que también es adecuada para determinar la afinidad por Fc gamma RIIIA (F158). De manera breve, en algunas modalidades, el anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado o afucosilado es capturado sobre un microcircuito de dextran recubierto con proteína A. El Fc gamma RIIIA (V158) (disponible de, por ejemplo, R&D Systems) es inyectado a varias concentraciones. La constante de asociación, constante de disociación, y afinidad de Fc gamma RIIIA (V158) por el anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado y afucosilado puede ser determinada, por ejemplo, usando el software proporcionado con el sistema de resonancia plasmónica superficial (por ejemplo, modelo de unión 1:1 de software de Evaluación Biacore T200). En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado con afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA (como Fc gamma RIIIA (V158) o Fc gamma RIIIA (F158)) se une a Fc gamma RIIIA con al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 17 veces, o al menos 20 veces mayor afinidad que un anticuerpo anti-FGFR2IIIb

fucosilado. Por ejemplo, si un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado se une a Fc gamma RIIIA (V158) con una afinidad (K_D) de 9.2 nM y un anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilados se une a Fc gamma RIIIA (V158) con una afinidad (K_D) de 207 nM, entonces el anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado se une a Fc gamma RIIIA (V158) con $207/9.2 = 22.5$ veces mayor afinidad que el anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado.

IV. Expresión y Producción de Anticuerpo Anti-FGFR2IIIb

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican para Anticuerpos Anti-FGFR2IIIb

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican para una o más cadenas de anticuerpos anti-FGFR2IIIb. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada y un polinucleótido que codifica una cadena ligera, de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb. En algunas modalidades, una primera molécula de ácido nucleico comprende un primer polinucleótido que codifica una cadena pesada y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende un segundo polinucleótido que codifica una cadena ligera.

En algunas de esas modalidades, la cadena pesada y la cadena ligera son expresadas de una molécula de ácido nucleico, o de dos moléculas de ácido nucleico separadas, como dos polipéptidos separados. En algunas modalidades, como cuando un anticuerpo es un scFv, un solo polinucleótido codifica para un solo polipéptido que comprende ambas de una cadena pesada y una cadena ligera enlazadas juntas sí.

En algunas modalidades, un polinucleótido que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia líder, la cual, cuando es traducida, se localiza en el N-terminal de la cadena pesada o la cadena ligera. Como se discutió anteriormente, la secuencia líder puede ser la secuencia líder de cadena pesada o ligera nativa, o puede ser otra secuencia líder heteróloga.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser construidas usando técnicas de ADN recombinante convencionales en la técnica. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico es un vector de expresión que es adecuado para la expresión en una célula anfitriona seleccionada.

Vectores

Son proporcionados vectores que comprenden polinucleótidos que codifican para cadenas pesadas de anti-FGFR2IIIb y/o cadenas ligeras de anti-FGFR2IIIb. También se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican para cadenas pesadas de anti-FGFR2IIIb y/o cadenas ligeras de anti-FGFR2IIIb. Esos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de ADN, vectores de fago, vectores virales, vectores retrovirales, etc. En algunas modalidades, un vector comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada y una segunda secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera. En algunas modalidades, la cadena pesada y la cadena ligera son expresadas de los vectores como dos polipéptidos separados. En algunas modalidades, la cadena pesada y la cadena ligera son expresadas como parte de un solo polipéptido, como, por ejemplo, cuando el anticuerpo es un scFv.

En algunas modalidades, un primer vector comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada y un segundo vector comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera. En algunas modalidades, el primer vector y el segundo vector son transfectados en células anfitrionas en cantidades similares (como cantidades molares similares o cantidades en masa similares). En algunas modalidades, una relación molar o en masa de entre 5:1 y 1:5 del primer vector y el segundo vector es transfectado a las células anfitrionas. En algunas modalidades, es usada una relación en masa entre 1:1 y 1:5 para el vector que codifica la cadena pesada y el vector que codifica la cadena ligera. En algunas modalidades, es usada una relación en masa de 1:2 para el vector que codifica la cadena pesada y el vector que codifica la cadena ligera.

En algunas modalidades, es seleccionado un vector que se está optimizado para la expresión de polipéptidos en células CHO o derivadas de CHO, o en células NSO. Esos vectores ejemplares son descritos, por ejemplo, en Running Deer *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

Células anfitrionas

En varias modalidades, las cadenas pesadas de anti-FGFR2IIIb y/o cadenas ligeras de anti-FGFR2IIIb pueden ser expresadas en células procarióticas, como células de bacterias; o en células eucarióticas, como células micóticas (como levadura), células de plantas, células de insectos y células de mamífero. Esa expresión puede ser llevada a cabo, por ejemplo, de acuerdo a procedimientos conocidos en la técnica. Las células eucarióticas ejemplares que

pueden ser usadas para expresar polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, células COS, incluyendo células COS 7; células 293, incluyendo células 293-6E; células CHO, incluyendo células CHO-S, DG44.Lec13 CHO, y células FUT8 CHO; células PER.C6® (Cruce)l; y células NSO. En algunas modalidades, las cadenas pesadas de anti-FGFR2IIIb y/o cadenas ligeras de anti-FGFR2IIIb pueden ser expresadas en levadura. Véase, por ejemplo, la Publicación Estadounidense No. US 2006/0270045 A1. En algunas modalidades, una célula anfitriona eucariótica particular es seleccionada por su capacidad para producir las modificaciones postranslacionales de las cadenas pesadas de anti-FGFR2IIIb y/o cadenas ligeras de anti-FGFR2IIIb. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células CHO producen polipéptidos que tienen un nivel mayor de sialilación que el mismo polipéptido producido en células 293.

La introducción de uno o más ácidos nucleicos en una célula anfitriona deseada puede ser efectuada por cualquier método, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextran, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, etc. Los métodos ejemplares no limitantes son descritos, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Los ácidos nucleicos pueden ser transfectados de manera transitoria o estable en las células anfitrionas deseadas, de acuerdo con cualquier método adecuado.

En algunas modalidades los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados son producidos en células capaces de producir anticuerpos afucosilados, como las células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente Estadounidense No. US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares modificadas, como líneas celulares que carecen de un gen alfa-1,6-fucosiltransferasa funcional, FUT8, por ejemplo, células CHO modificadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados son producidos en células CHO que carecen de un gen FUT8 funcional. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados son producidos en células Potelligent® CHOK1SV (BioWa/Lonza, Allendale, NJ).

Purificación de Anticuerpos Anti-FGFR2IIIb

Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb pueden ser purificados por cualquier método adecuado. Esos métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de matrices de afinidad o cromatografía de interacción hidrofóbica. Los ligandos de afinidad adecuados incluyen el ECD FGFR2IIIb y ligandos que se une a regiones constantes del anticuerpo. Por ejemplo, puede ser usada una columna de afinidad de proteína A, proteína G, proteína A/G, o un anticuerpo para unir la región constante y para purificar un anticuerpo anti-FGFR2IIIb. La cromatografía interactiva hidrofóbica, por ejemplo, una columna de butilo o fenilo, también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos. Muchos métodos de purificación de polipéptidos son conocidos en la técnica.

Producción Libre de Células de Anticuerpos Anti-FGFR2IIIb

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb es producido en un sistema libre de células. Los sistemas libres de células ejemplarse no limitantes son descritos, por ejemplo, en Sitaraman *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22:538-45 (2004); Endo *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

V. Composiciones y Métodos Terapéuticos

Métodos de tratamiento de Enfermedades usando Anticuerpos Anti-FGFR2IIIb

Los anticuerpos de la invención, y las composiciones que comprenden los anticuerpos de la invención, son proporcionados para usarse en métodos de tratamiento para humanos o animales. También son proporcionados métodos de tratamiento de enfermedades que comprenden administrar anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados. Las enfermedades ejemplares no limitantes que pueden ser tratadas con anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados incluyen, pero no se limitan a cáncer. En algunas modalidades, son proporcionados métodos de tratamiento de cáncer, que comprenden administrar un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado. En algunas modalidades, el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, o cáncer esofágico. En algunas modalidades, son proporcionados métodos de tratamiento de cáncer gástrico, que comprenden administrar un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado.

En algunas modalidades, un cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, un cáncer que comprende una amplificación del gen de FGFR2 que sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer comprende una amplificación de FGFR2 que

sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer que comprende la amplificación de FGFR2 que expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es mayor que 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En algunas modalidades, un cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende la amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, un cáncer gástrico comprende una amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, un cáncer gástrico comprende una amplificación del gen de FGFR2 que sobreexpresa FGFR2IIIb. En algunas modalidades, un cáncer gástrico comprende la amplificación de FGFR2 que sobreexpresa FGFR2IIIb en un grado mayor que FGFR2IIIc. En algunas modalidades, un cáncer gástrico comprende la amplificación de FGFR2 que expresa FGFR2IIIb a un nivel normalizado que es mayor que 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el nivel normalizado de expresión de FGFR2IIIc. En algunas modalidades, los niveles de expresión son normalizados a GUSB. En algunas modalidades, un cáncer gástrico sobreexpresa FGFR2IIIb pero no comprende la amplificación del gen de FGFR2. En algunas modalidades, la sobreexpresión es la sobreexpresión de ARNm. En algunas modalidades, la sobreexpresión es sobreexpresión de proteína.

La amplificación del gen de FGFR2IIIb puede ser determinada por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, hibridación in situ (ISH). En algunas modalidades, la amplificación de FGFR2 comprende una relación de FGFR2:CEN10 (centrómero del cromosoma 10) de >3 .

La sobreexpresión de ARNm de FGFR2IIIb puede ser determinada por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, métodos que comprenden PCR cuantitativa (qPCR). El término "sobreexpresión de ARNm de FGFR2IIIb" significa niveles elevados de ARNm de FGFR2IIIb, sin importar la causa de esos niveles elevados (es decir, si los niveles elevados son resultado de transcripción incrementada y/o degradación disminuida de ARNm, otro mecanismo, o una combinación de mecanismos).

La sobreexpresión de proteína de FGFR2IIIb puede ser determinada por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, métodos basados en anticuerpo como inmunohistoquímica (IHC). En algunas modalidades, la tinción con IHC es calificada de acuerdo al método en la técnica. El término "sobreexpresión de proteína de FGFR2IIIb" significa niveles elevados

de proteína de FGFR2IIIb, sin importar la causa de esos niveles elevados (es decir, si los niveles elevados son resultados de traducción incrementada y/o degradación disminuida de proteína, otro mecanismo, o una combinación de mecanismos). En algunas modalidades, la tinción de 1+, 2+, o 3+ de células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción de 2+ o 3+ de células tumorales por IHC indica sobreexpresión de FGFR2IIIb. En algunas modalidades, la tinción de IHC es calificada como se describe en el Ejemplo 6.

Composiciones Farmacéuticas

En varias modalidades, son proporcionadas composiciones farmacéuticas que comprende anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados en formulaciones con una amplia variedad de portadores farmacéuticamente aceptables (véase, *por ejemplo*, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Varios portadores farmacéuticamente aceptables, los cuales incluyen vehículos, adyuvantes, y diluentes, se encuentran disponibles. Además, varias sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, como agentes para ajustar el pH y amortiguadores, agentes para ajustar la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, también se encuentran disponibles. Los portadores ejemplares no limitantes incluyen, solución salina, solución salina amortiguada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos.

En varias modalidades, las composiciones que comprenden anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados pueden ser formuladas para inyección, incluyendo administración subcutáneas, disolviéndolas, suspendiéndolas, o emulsificándolas en un solvente acuoso o no acuoso, como aceites vegetales u otros, glicéridos, ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores, o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales como estabilizadores, agentes isotónicos, agentes suspensores, agentes emulsificantes, estabilizadores y preservativos. En varias modalidades, las composiciones pueden ser formuladas para inhalación, por ejemplo, usando propelentes presurizados aceptables como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Las composiciones también pueden ser formuladas, en varias modalidades, en microcápsulas de liberación sostenida, como con polímeros biodegradables o no

biodegradables. Una formulación biodegradable ejemplar no limitante incluye polímero de ácido poliláctico-ácido glicólico. Una formulación no biodegradable ejemplar no limitante incluye un éster de ácido graso de poliglicerina. Ciertos métodos para producir esas formulaciones son descritos, por ejemplo, en la EP 1 125 584 A1.

Rutas de Administración

En varias modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados pueden ser administrados *in vivo* por varias rutas, incluyendo, pero sin limitarse a, oral, intraarterial, parenteral, intranasal, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, intratraqueal, bucal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, tópica, transdérmica, e intratecal, o de otro modo por implantación o inhalación. Las composiciones objeto de la presente pueden ser formuladas en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas; incluyendo, pero sin limitarse a, tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, enemas, inyecciones, inhalantes y aerosoles. La formulación y ruta de administración adecuadas pueden ser seleccionadas de acuerdo a la aplicación pretendida.

Las composiciones farmacéuticas son administradas en una cantidad efectiva para el tratamiento o profilaxis del cáncer, como el cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, o cáncer esofágico. La cantidad terapéuticamente efectiva depende típicamente del peso del sujeto que esté siendo tratado, o su condición física o de salud, la extinción de la condición a ser tratada, o la edad del sujeto que esté siendo tratado. En general los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados pueden ser administrados en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 µg/Kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/Kg de peso corporal por dosis. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados puede ser administrados en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 50 µg/Kg de peso corporal hasta aproximadamente 5 mg/Kg de peso corporal por dosis. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb puede ser administrados en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 µg/Kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg/Kg de peso corporal por dosis. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados puede ser administrados en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 µg/Kg de peso corporal hasta aproximadamente 20 mg/Kg de peso corporal por dosis. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados puede ser

administrados en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.5 mg/Kg de peso corporal hasta aproximadamente 20 mg/Kg de peso corporal por dosis.

En las composiciones de anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado pueden ser administradas según sea necesario a los sujetos. La determinación de la frecuencia de administración puede ser administrada por expertos en la técnica, como el médico que atienda sobre la base de consideraciones de la condición que esté siendo tratada, la edad del sujeto que esté siendo tratado, la severidad de la condición que esté siendo tratada, el estado general de salud del sujeto que esté siendo tratado y similares. En algunas modalidades, una dosis efectiva de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrada a un sujeto una o más veces. En varias modalidades, es administrada una dosis efectiva de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado al sujeto una vez al mes, más de una vez al mes, como, por ejemplo, cada dos meses o cada tres meses. En otras modalidades, una dosis efectiva de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrada menos de una vez al mes, como, por ejemplo, cada dos semanas o cada semana. Una dosis efectiva de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrada al sujeto al menos una vez. En algunas modalidades, la dosis efectiva de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado puede ser administrada múltiples veces, incluyendo durante periodos de al menos un mes, al menos seis meses, o al menos un año.

Terapia de Combinación

Los anticuerpos anti-FGFR2IIIb fucosilados pueden ser administrados solos o con otros modos de tratamiento. Ellos pueden ser proporcionados antes, de manera sustancialmente contemporánea con, o después de otros modos de tratamiento, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, o terapia de radiación. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrado en conjunto con otro agente anticáncer. Los agentes anticáncer ejemplares no limitantes que pueden ser administrados con un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado incluyen agentes de platino (como cisplatino, oxaliplatino, y carboplatino), paclitaxel (TAXOL®), formulación de paclitaxel en nanopartículas modificadas con albúmina (ABRAXANE®), docetaxel (TAXOTERE®), gemcitabina (GEMZAR®), capecitabina (XELODA®), irinotecano (CAMPTOSAR®), epirubicina (ELLENCE®, PHARMORUBICIN®), FOLFOX (oxaliplatino combinado con 5-FU y leucovorina), FOLFIRI (combinación de leucovorina, 5-FU e irinotecano), leucovorina, fluorouracilo (5-FU, EFUDEX®), mitomicina C (MITOZYTREX™, MUTAMYCIN®), y clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin PFS, Adriamycin RDF,

RUBEX®). En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrado en conjunto con paclitaxel. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrado en conjunto con cisplatino y/o 5-FU. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrado en conjunto con cisplatino y 5-FU. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado es administrado en conjunto con FOLFOX (oxaliplatino, 5-FU, y leucovorina).

Equipos/Artículos de Manufactura

La invención también proporciona equipos, medicinas, composiciones, y formas de dosificación unitaria para usarse en cualquiera de los métodos descritos aquí.

Los equipos de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado (o formas de dosificación unitaria y/o artículos de manufactura). En algunas modalidades, es proporcionada una dosis unitaria donde la dosis unitaria comprende una cantidad predeterminada de una composición que comprende un anticuerpo anti-FGFR2IIIb afucosilado, con o sin uno o más agentes adicionales. En algunas modalidades, esa dosis unitaria es proporcionada en una jeringa prellenada de un solo uso para inyección. En varias modalidades, la composición contenida en la dosis unitaria puede comprender solución salina, sacarosa, o similares; un amortiguador, como fosfato o similares; y/o ser formulada dentro de un intervalo de pH estable y efectivo. De manera alternativa, en algunas modalidades, la composición puede ser proporcionada como un polvo liofilizado que pueda ser reconstituido tras la adición de un líquido apropiado, por ejemplo, agua estéril. En algunas modalidades, la composición comprende una o más sustancias que inhiben la agregación de proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, sacarosa y arginina. En algunas modalidades, una composición de la invención comprende heparina y/o un proteoglicano.

En algunas modalidades, los equipos de la invención comprenden además instrucciones de uso en el tratamiento de, *por ejemplo*, el cáncer (como cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, o cáncer esofágico) de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. El equipo puede comprender además una descripción de la selección de un individuo o tratamiento adecuado. Las instrucciones proporcionadas en el equipo de la invención son típicamente instrucciones escritas sobre una etiqueta o inserto de paquete (*por ejemplo*, una hoja de papel incluida

en el equipo), pero también son aceptables instrucciones legibles por una máquina (*por ejemplo*, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico). En algunas modalidades, el equipo comprende además otro agente terapéutico.

Los equipos de la invención se encuentran en embalajes adecuados. El embalaje adecuado, incluye pero no se limita a, frascos, botellas, recipientes, paquetes flexibles (*por ejemplo*, bolsas de Mylar o plásticas), y similares. Los equipos pueden opcionalmente proporcionar componentes adicionales como amortiguadores e información interpretativa. La presente solicitud proporciona de este modo también artículos de manufactura, los cuales incluyen frascos (como frascos sellados), botellas, recipientes, envases flexibles, y similares.

EJEMPLOS

Los ejemplos discutidos más adelante pretenden ser puramente ejemplares de la invención y no deberán considerarse como limitantes de la invención de ninguna manera. Los ejemplos no pretenden dar a entender que los siguientes experimentos son los únicos experimentos efectuados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (*por ejemplo*, cantidades, temperatura, *etc.*) pero podrán ser encontrados algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Centígrados, y la presión atmosférica es o está cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1: Producción de Anticuerpo Anti-FGFR2IIIb Afucosilado.

Construcción del vector de expresión. Secuencias Nucleotídicas que codifican para la cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) del anticuerpo monoclonal α FGFR2b fueron clonadas en el Sistema de Expresión Genética GS (Lonza, Basel, Suiza) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El sistema genera un vector genético doble (DGV) que contiene los casetes de expresión para ambas de la cadena ligera y la cadena pesada.

Selección de la línea celular anfitriona. Para generar el anticuerpo monoclonal afucosilado α FGFR2bA (la designación "A" después de α FGFR2b se refiere a "afucosilado"), elegidas las células Potelligent® CHOK1SV (BioWa/Lonza, Allendale, NJ) como la línea celular anfitriona. Las células Potelligent® CHOK1SV carecen del gen de *FUT8* (α 1,6-fucosiltransferasa) y por lo tanto producen anticuerpos sin fucosa (anticuerpos afucosilados).

Construcción de la línea celular estable para la producción de anticuerpo α FGFR2bA afucosilado: El vector de expresión que comprende las secuencias nucleotídicas que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo α FGFR2b descrito anteriormente transfectado en células Potelligent® CHOK1SV por electroporación de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células electroporadas fueron sembradas en una placa de 96 pozos a aproximadamente 10,000 células/50 μ L/pozo en medios CD CHO sin L-glutamina. El medio CD CHO selectivo que contiene 67 μ M de L-metionina sulfoximina (MSX, SIGMA cat#M5379, St. Louis, MO) fue agregado al siguiente día a 150 μ L/pozo. El crecimiento celular y formación del clon fue verificado con un IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Después de 4-6 semanas, las colonias sobrevivientes fueron seleccionadas por la expresión de anticuerpo α FGFR2bA usando un ensayo basado en Fluorescencia Resuelta por Tiempo Homogéneo (HTRF) contra curvas estándar generadas con anticuerpo α FGFR2b purificado, usando proteína A conjugada con XL665 e IgG de conejo policlonal conjugada con criptato (Cisbio, Bedford, MA). Los clones con mayor expresión fueron expandidos a través de una serie de procesos de producción incrementando la escala, incluyendo placas de 24 pozos, tubos giratorios, matraces de agitación, biorreactores a escala de laboratorio, y finalmente un proceso de producción en plataforma. En cada paso, únicamente un subconjunto que comprende los clones de mayor expresión fue llevado al siguiente proceso. El clon de producción final fue seleccionado sobre la base de la evaluación de títulos de producto de proteína, características de crecimiento celular, calidad del producto, estabilidad, así como escalabilidad en biorreactores. La línea de producción final tuvo un nivel de expresión de aproximadamente 3.5 g/L para α FGFR2bA. La falta de fucosilación en α FGFR2bA producido en la línea celular de producción final fue confirmada usando cromatografía HLPC en fase normal (N-HPLC).

El anticuerpo α FGFR2bA fue purificado por cromatografía en columna y ultrafiltración para concentrar el material purificado, entonces por diafiltración cambiando al amortiguador de formulación (histidina 20 mM, L-arginina 150 mM, polisorbato 20 al 0.01%, pH 6.0). El anticuerpo fue almacenado por debajo de -70°C.

El análisis de glicano del α FGFR2bA es efectuado liberando glicanos de la proteína, marcando los glicanos con ácido antranílico (2-AA), y purificando entonces los glicanos marcados. Se usó HPLC en fase normal con detección

fluorescente para separar los glicanos y medir la cantidad relativa de cada glicano en el anticuerpo. La Figura 7 muestra que el α FGFR2b derivado de la línea celular Potelligent® CHOK1SV y el α FGFR2b en CHOK1SV tuvo dos distribuciones de glicano diferentes. (A) La distribución de glicano de α FGFR2b derivado de la línea celular Potelligent® CHOK1SV muestra que el anticuerpo carece de fucosa (“G0”). (B) La distribución de glicano del α FGFR2b derivado de la línea celular CHOK1SV muestra que el anticuerpo contiene fucosa (“G0F”).

Los picos de glicano de la separación por HPLC en fase normal fueron identificados usando dos métodos ortogonales. Primero, el α FGFR2b producido por Potelligent® CHOK1SV fue marcado y separado usando el método de HPLC en fase normal. Después de la detección fluorescente, los glicanos fueron pasados a través de un espectrómetro QTrap de masas. La masa de cada pico fue determinada y usada para identificar positivamente cada glicano, y se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Masa de los Picos de Glicano

Glicano	Masa Teórica (Da)	Masa Observada (Da)
G0	1437	1437.4
Man-5	1355	1355.3
G1	1600	1599.4

La masa de cada forma fucosilada de los glicanos (G0F, G1F, y G2F) también fue buscada en el α FGFR2b producido por Potelligent® CHOK1SV y no fue observada. La Figura 8 muestra diagramas esquemáticos de las estructuras de glicanos G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F, y manosa-5 (o Man-5) típicamente observadas en anticuerpos.

Las identidades de pico del ensayo de HPLC también fueron confirmadas usando estándares de glicano comprados de Prozyme y comparando el tiempo de retención entre los estándares y los perfiles de α FGFR2 de ambas de la línea celular Potelligent® CHOK1SV y la línea celular CHOK1SV. Esos estándares también pudieron identificar G0, G0F, Man5, G1, G1F, y G2F.

Los resultados del ensayo de HPLC así como los datos de caracterización confirmaron la ausencia de fucosilación en el α FGFR2 derivado de

la línea celular Potelligent® CHOK1SV.

Ejemplo 2: Afinidad de Unión del Anticuerpo Anti-FGFR2b Afucosilado.

Las afinidades de unión de αFGFR2bA y αFGFR2bF (la designación “F” después de αFGFR2b se refiere a “fucosilado”) por Fc gamma RIIIA(V158) fueron determinadas por resonancia plasmónica superficial. De manera breve, la Proteína A fue unida covalentemente a un microcircuito de dextran usando el Equipo de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) y etilenediamina a 100mM (Sigma) en amortiguador de borato de sodio a 100mM, pH 8.0 (Sigma, St. Louis, MO) como el reactivo de bloqueo. Se capturaron aproximadamente 600-800 UR de αFGFR2bA y αFGFR2bF sobre células de flujo separadas y una célula del flujo derivada de Proteína A (Pierce) sirvió como un control de referencia. El Fc gamma RIIIA (V158) (R&D Systems, Minneapolis, MN) fue diluido en amortiguador de usuario HBS-P+ (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ) e inyectado a 5 concentraciones (0 nM, 12.3 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM, y 1000 nM) por duplicado. La constante de asociación, la constante de disociación, y la afinidad por αFGFR2bA fueron calculadas usando el modelo del software de Evaluación Biacore T200 1:1. La constante de afinidad para la unión de αFGFR2bF fue determinada usando el modelo de afinidad de estado de Evaluación Biacore T200. Los resultados se muestran en Tabla 3.

Tabla 3: afinidades del anticuerpo αFGFR2bA y αFGFR2bF por Fc gamma RIIIA(V158)

αFGFR2b	K_D (k_d/k_a) (nM)	k_a (1/Ms) $\times 10^3$	k_d (1/ms)
A	9.2	940.1	8.6
F	207	--	--

Como se muestra en la Tabla 3, el Fc gamma RIIIA(V158) se unió a αFGFR2bA con una afinidad mayor de 20 veces la unión de αFGFR2bF.

Ejemplo 3: Actividad del ADCC del Anticuerpo Anti-FGFR2b Afucosilado.

Se efectuaron ensayos *in vitro* para determinar la actividad de ADCC del anticuerpo αFGFR2bA contra el anticuerpo αFGFR2bF. Las células blanco que expresan FGFR2IIIb Ba/F3 fueron producidas como sigue. Células Ba/F3

adquiridas de Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, # de cat ACC300, Braunschweig, Alemania) fueron mantenidas en RPMI (Mediatech, # de cat 10-041-CV, Manassas, VA), suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (Mediatech, # de cat 35-010-CV), 1 ng/mL de murina IL-3 (PeproTech, # de cat 213-13, Rocky Hill, NJ), 1X BME (Invitrogen, # de cat 1047574, Grand Island, NY), y 1X de Penicilina-estreptomicina (Mediatech # de cat 30-002-CI). Las células Ba/F3 fueron transfectadas con un vector de expresión que expresa FGFR2IIIb, pBNew-hFGFR2b, usando el Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza, # de cat VCA-1003) siguiendo el protocolo del fabricante. El vector pBNew contiene un promotor de CAG con un intrón de β -actina de pollo y genes de selección de crecimiento de ampicilina y puromicina. Las células transfectadas fueron incubadas en medio de crecimiento completo durante 3 días entonces tratadas con 2 μ g/mL de puromicina (InvivoGen, cat # ant-pr-1, San Diego, CA). La selección de puromicina fue mantenida a través del cultivo. Para generar clones estables individuales, las células fueron cultivadas a una densidad de 1 célula por 3 pozos. Se usó clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) con un anticuerpo anti-FGFR2IIIb para seleccionar los clones con el nivel más alto de expresión de FGFR2IIIb.

Las células MFM-223 fueron obtenidas de Health Protection Agency, RU; las células OCUM-2M fueron obtenidas de Osaka City University, Osaka, Japón; y las células KATO III fueron obtenidas de ATCC, Rockville, MD. Todas las células fueron cultivadas usando métodos estándar. Las PMBC recién aisladas de donadores sanos fueron obtenidas de AllCells, Emeryville, CA.

Los ensayos de ADCC fueron realizados usando células efectoras de 3 donadores independientes en días 3 días diferentes. La prueba de ensayo de ADCC fue efectuada usando PBMCs humana recién aisladas como células efectoras a una relación de célula efectora a blanco (E/T) de 25:1. Las células blanco fueron incubadas durante 16 horas en presencia de efectores y concentraciones crecientes de anticuerpo. El ensayo de ADCC fue validado usando 2 anticuerpos de control positivo, HERCEPTIN® sobre SKOV-3 células blanco y RITUXIN® sobre células blanco Raji. Se usó un anticuerpo de control negativo de IgG1 completamente humano (Eureka Therapeutics, Catalog ET901, Emeryville, CA) para la citotoxicidad celular no específica. La citotoxicidad fue determinada cuantificando la liberación de LDH de acuerdo a las instrucciones del fabricante (CytoTox Non Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, WI).

La lisis máxima fue determinada en presencia de Tritón X-100 al 5%, y la liberación espontánea fue determinada en ausencia de anticuerpo. El porcentaje de lisis específica fue calculado como sigue, como un porcentaje de lisis máxima de la liberación espontánea:

$$(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}) \times 100 = \% \text{ de lisis específica}$$

Los resultados de las células Ba/F3 se muestran en la Figura 1. El anticuerpo α FGFR2bA afucosilado indujo mayor lisis específica que el anticuerpo α FGFR2bF fucosilado en células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb. En células OCUM-2M, MFM 223, y KATO III, el α FGFR2bA mostró mayor actividad de ADCC a concentraciones más bajas que el α FGFR2bF, aunque la lisis específica máxima de los anticuerpos fue comparable en células OCUM-2M y MFM 223 (no se muestran los datos). Además, el α FGFR2b mostró poca o ninguna actividad de ADCC en células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIc. Véase la Figura 1A.

Ejemplo 4: Actividad del Anticuerpo Anti-FGFR2b Afucosilado en Modelos de Xenoinjerto de Cáncer Gástrico y Cáncer de Mama.

Ratones CB17 SCID hembra de seis semanas de edad fueron comprados de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) y fueron aclimatados durante 1 semana antes del inicio del estudio. Se usó la línea celular de carcinoma gástrico humano OCUM-2M o la línea celular de cáncer de mama MFM-223 como los modelos de tumor. La OCUM-2M fue comprada de Public University Corporation Osaka City University (OCU, Osaka, Japón), y la MFM-223 fue comprada de Culture Collections, Public Health England (98050130, HPA Culture Collections, Salisbury, RU). Las células fueron cultivadas hasta tres pases en medio de crecimiento completo para expandirse para el implante. Las células OCUM-2M y MFM-223 fueron cultivadas en medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) y Medio Esencial Mínimo (MEM), respectivamente. Todo el medio fue suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) inactivado con calor, L-Glutamina 2 mM, y solución de Penicilina-Estreptomicina. Las células se hicieron crecer a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Cuando las células cultivadas alcanzaron una confluencia de 85%-90%, las células fueron cosechadas y suspendidas en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) Ca²⁺ y Mg²⁺ que contenía 50% de Matrigel (BD BioSciences, San Jose, CA). Las células OCUM-2M fueron implantadas subcutáneamente

sobre el flanco derecho de los ratones a 5×10^5 células/100 μ L/ratón. Las células MFM-223 fueron implantadas subcutáneamente sobre el flanco derecho de los ratones a 5×10^5 células/100 μ L/ratón, y fueron inoculadas subcutáneamente plaquitas de 17- β estradiol que liberan 0.72 mg en 90 días (Innovative Research de America, Sarasota, FL) los ratones fueron verificados dos veces semanalmente después de la implantación celular para el crecimiento tumoral. El tamaño del tumor fue medido de acuerdo a la fórmula: tamaño del tumor (mm^3) = (ancho (mm) x longitud (mm)²)/2. Cuando los tumores MFM-223 alcanzaron 80 mm^3 , los ratones fueron clasificados y aleatorizados (n=10), y se inició el tratamiento. Para tumores OCUM-2M, se inició una sola terapia con anti-FGFR2b una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 mm^3 , la terapia de combinación se inició una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 250 mm^3 .

Se administró anticuerpo anti-FGFR2IIIb humanizado (afucosilado, α FGFR2bA; fucosilado, α FGFR2bF) o albúmina como control negativo a dosis que fluctúan de 1 mg/Kg a 10 mg/Kg vía inyección intraperitoneal dos veces por semana como se especifica en las leyendas de la Figura. Los agentes quimioterapéuticos fueron administrados vía inyección intraperitoneal dos veces por semana a 12 mg/Kg para el paclitaxel, 2.3 mg/Kg para el fluorouracilo (5-FU), y 33 mg/Kg para el cisplatino. Después del inicio de la terapia, los tamaños de los tumores fueron medidos en cada ratón dos veces a la semana. La longitud y ancho de cada tumor fue medida usando calibradores y el tamaño del tumor calculado de acuerdo a la fórmula anterior. Los ratones fueron sacrificados por eutanasia cuando los volúmenes del tumor subcutáneo excedieron de 2000 mm^3 o cuando los tumores se volvieron excesivamente necróticos.

Las comparaciones del volumen del tumor como consecuencia fueron determinadas como estadísticamente significativas si $P < 0.05$. Los valores de P fueron calculados usando análisis de prueba t de dos colas, sin aparear de los volúmenes de tumor calculados el día final después de que los tumores fueron medidos.

La Figura 2 muestra la eficacia de α FGFR2bA y α FGFR2bF a (A y B) 10 mg/Kg y (C y D) 3 mg/Kg en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano OCUM-2M con amplificación de FGFR2. (A) A 10 mg/Kg, ambos anticuerpos fucosilado y afucosilado indujeron regresión inmediata del tumor. Sin embargo, α FGFR2bA afucosilado indujo una respuesta más durable que la del α FGFR2bF fucosilado. (B) El α FGFR2bA afucosilado redujo significativamente el tamaño final del tumor OCUM-2M en comparación con el α FGFR2bF fucosilado

($p=0.0153$). El significado estadístico fue determinado vía la prueba t no apareada de dos colas. (C) Cuando la dosis a 3 mg/Kg, α FGFR2bA afucosilado redujo el tamaño del tumor en comparación del α FGFR2bF fucosilado. En realidad, el α FGFR2bA afucosilado indujo una mayor regresión del tumor y respuesta durable en comparación con el α FGFR2bF fucosilado (nota: un animal fue removido del grupo de α FGFR2bF aproximadamente el día 42, lo que dio como resultado una desviación en la curva). (D) El α FGFR2bA afucosilado a 3 mg/Kg comparado con el α FGFR2bF fucosilado redujo notablemente el tamaño del tumor OCUM-2M final ($p=0.0767$). El significado estadístico fue determinado vía la prueba t no apareada de dos colas.

La Figura 3 muestra la inhibición del tumor dependiente de la dosis por el α FGFR2bA. (A) Ratones SCID con xenoinjertos OCUM-2M fueron tratados con 1, 1.5, 2, 3, o 5 mg/kg α FGFR2bA afucosilado cuando el tamaño del tumor promedio alcanzó aproximadamente 100 mm³. Aunque todas las dosis de α FGFR2bA afucosilado inhibieron el crecimiento del tumor, la mayor supresión y respuesta durable fueron observadas con 3 y 5 mg/kg, con supresión del crecimiento reducida observada con 2, 1.5, y 1 mg/kg de α FGFR2bA. (B) El α FGFR2bA afucosilado redujo el tamaño del tumor OCUM-2M final, con las dosis más altas mostrando la supresión del tumor más potente. La supresión de crecimiento del tumor fue estadísticamente significativa para todas las dosis (5 mg/kg, $p<0.0001$; 3 mg/kg, $p<0.0001$; 2 mg/kg, $p<0.0001$; 1.5 mg/kg, $p=0.0003$; 1 mg/kg, $p=0.0013$). El significado estadístico fue determinado vía la Prueba t no apareada, de dos colas.

La Figura 4 muestra la mejora de la actividad antitumoral del paclitaxel en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico OCUM-2M por administración con α FGFR2bA afucosilado. (A) Ratones SCID con xenoinjertos OCUM-2M fueron tratados con α FGFR2bA afucosilado (5 mg/kg), paclitaxel (12 mg/kg), o una combinación de los dos cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó aproximadamente 285 mm³. La combinación de α FGFR2bA afucosilado con paclitaxel redujo el tamaño del tumor comparada con cualquiera del α FGFR2bA o paclitaxel solo. (B) La terapia con α FGFR2bA/paclitaxel combinado redujo significativamente el tamaño del tumor OCUM-2M final comparada con cualquiera del paclitaxel ($p=0.0005$) o α FGFR2bA ($p=0.0009$) solo. El significado estadístico fue determinado vía la Prueba t no apareada, de dos colas.

La Figura 5 muestra la mejora de la actividad antitumoral del cisplatino/5-FU en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico OCUM-2M por

administración con α FGFR2bA afucosilado. (A) Ratones SCID con xenoinjertos OCUM-2M fueron tratados con α FGFR2bA afucosilado (5 mg/kg), fluorouracilo (5-FU) más cisplatino (2.3 y 33 mg/kg, respectivamente), o una combinación de los tres cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó aproximadamente 260 mm³. La combinación de α FGFR2bA afucosilado con 5-FU/cisplatino redujo el tamaño del tumor comparado con cualquiera del α FGFR2bA o 5-FU/cisplatino solo. (B) La terapia con α FGFR2bA/5-FU/cisplatino combinados, redujo significativamente el tamaño del tumor OCUM-2M final comparada con 5-FU/cisplatino ($p=0.0003$). La reducción incrementada en el tamaño del tumor por terapia con α FGFR2bA/5-FU/cisplatino combinados, comparada con α FGFR2bA solo fue notable pero no estadísticamente significativa. El significado estadístico fue determinado vía la Prueba t no apareada, de dos colas.

La Figura 6 muestra la eficacia del α FGFR2bA en un modelo de xenoinjerto de cáncer mama humano MFM-223. (A) MFM-223, una línea celular de carcinoma de mama humano con amplificación de FGFR2, fue implantada subcutáneamente en ratones SCID, y la terapia con α FGFR2bA afucosilado fue iniciada cuando el tamaño promedio del tumor promedio alcanzó aproximadamente 80 mm³. El α FGFR2bA afucosilado (5 mg/kg) redujo dramáticamente el crecimiento de tumores MFM-223 comparado con el control de albúmina (5 mg/kg). (B) El α FGFR2bA afucosilado redujo significativamente el tamaño final del tumor MFM-223 comparado con el control de albúmina ($p=0.0008$). El significado estadístico fue determinado vía la Prueba t no apareada, de dos colas.

Ejemplo 5: El Anticuerpo Anti-FGFR2b Afucosilado Media una ADCC Mayor que el Anticuerpo Anti-FGFR2b Fucosilado.

Se efectuaron ensayos *In vitro* para determinar la actividad de ADCC del anticuerpo α FGFR2bA contra el anticuerpo α FGFR2b. Las células blanco que expresan Ba/F3 FGFR2IIIb fueron generadas como se describió anteriormente. Las células OCUM-2M fueron obtenidas de la Osaka City University, Osaka, Japón. Todas las células fueron cultivadas usando métodos estándar. Las PMBC recién aisladas fueron obtenidas de donadores sanos de AllCells, Emeryville, CA.

Los ensayos de ADCC fueron realizados usando PBMCs humanas recién aisladas como células efectoras a una relación de célula efectora a blanco (E:T) de 25:1. Las células blanco fueron incubadas durante 16 horas en presencia de los efectores e incrementando las concentraciones de anticuerpo. Todas las condiciones fueron probadas por triplicado. La citotoxicidad fue determinada

cuantificando la liberación de LDH de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Ensayo de Citotoxicidad No Radiactiva CytoTox de Promega). Para las células OCUM-2M, la lisis máxima fue determinada en presencia de Triton X-100 al 5%, y la liberación espontánea fue determinada en ausencia de anticuerpo. El porcentaje de lisis específica fue calculado como un porcentaje de la máxima menos la liberación espontánea, como sigue: (liberación experimental – espontánea) / (liberación máxima – espontánea) x 100 = % de lisis específica. Se usó el análisis de ajuste de curva del software GraphPad para obtener los valores de CE50.

Los resultados para las células Ba/F3 se muestran en la Figura 9. El anticuerpo αFGFR2bA afucosilado mostró mayor potencia (mayor actividad de ADCC a concentraciones más bajas) que el anticuerpo αFGFR2bF fucosilado en células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb. Resultados similares son mostrados por las OCUM-2M en La Figura 10. La Tabla 4 muestra la las veces del incremento de la potencia del anticuerpo anti-FGFRb afucosilado con el anticuerpo anti-FGFR2b fucosilado en las dos líneas celulares diferentes mostradas en las Figures 9 y 10.

Tabla 4: Veces del Incremento de la Potencia del anticuerpo anti-FGFR2b afucosilado contra el fucosilado

CE50 (ng/mL)			
Células	αFGFR2bA	αFGFR2bF	Veces del Incremento de la Potencia de αFGFR2bA
OCUM-2M	5	30	6
BaF3	2	16	8
FGFR2b			

Ejemplo 6: Detección Immunohistoquímica de la Proteína FGFR2IIIb en Tejido Tumoral.

Se usó anticuerpo murino αFGFR2b que comprende las regiones variables murinas de GAL-FR21 (véase la Patente Estadounidense No. 8,101,723 B2) y una región constante de IgG2a murina para detectar la proteína FGFR2IIIb en tejido de tumor gástrico incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE). El

tejido tumoral FFPE fue desparafinizado con lavados sucesivos de xileno y concentraciones decrecientes de etanol, y rehidratado con agua durante cinco minutos. Cortes de tejido montados sobre portaobjetos fueron sumergidos en amortiguador de citrato 0.1 mM (pH 6.0) calentado a 95°-99°C durante 15 minutos. Los cortes de tejido fueron enfriados y puestos en contacto con H_2O_2 al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente, y entonces lavados dos veces en TBST (Tris 0.05M, NaCl 0.15M, Tween 20 al 0.05%) y bloqueados en amortiguador de bloqueo (suero de caballo normal al 2.5% en TBST) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes de tejido fueron entonces incubados con 5 µg/ml de anticuerpo α FGFR2b en amortiguador de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tiempos de incubación de entre 30 minutos y 2 horas produjeron intensidades de tinción similares. Después de tres lavados con amortiguador TBST, los cortes de tejido fueron incubados con anticuerpo anti-ratón de caballo secundario biotinilado (RTU) listo para usarse (10 µg/ml diluido en amortiguador de bloqueo (Vector Laboratories, Burlingame, CA; No. de Cat. PK-7200) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes de tejido fueron lavados dos veces con Amortiguador TBST, e incubados con estreptavidina-peroxidasa de rábano RTU (HRP; Vector Laboratories, No. de Cat. PK-7200) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección fue efectuada usando sustrato de 3',3'-diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories, No. de Cat. PK-4105) durante diez minutos a temperatura ambiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cortes de tejido fueron entonces contrateñidos con hematoxilina (Dako North America, Carpinteria, CA, No. de Cat. K-8008) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cortes de tejido fueron deshidratados usando lavados sucesivos con concentraciones crecientes de etanol y xileno, y entonces cubiertos con un cubreobjetos.

Se encontró que concentraciones de tinción de 0.1 a 5 mg/ml de anticuerpo α FGFR2b eran particularmente efectivas para la detección de la proteína.

La tinción fue calificada como sigue:

- 0 Sin tinción con anticuerpo α FGFR2b observada
- 1+ Es observada una tinción débil en muestras teñidas con el anticuerpo α FGFR2b. La tinción está ausente en los cortes correspondientes teñidos con el anticuerpo de control negativo.
- 2+ La tinción de la membrana citoplásmica específica para el anticuerpo α FGFR2b prevalece más en los cortes.

3+ Tinción específica fuerte con anticuerpo αFGFR2b con distinta localización de membrana en al menos un subconjunto de células tumorales teñidas.

La Figura 11 muestra la tinción ejemplar 0 (A), 1+ (B, C), 2+ (D), y 3+ (E, F) de tejidos tumorales. En la Figura 11A, las célula ductales y células tumorales entremezcladas muestran una ausencia de tinción usando el anticuerpo αFGFR2b. En la Figura 11B, la cual muestra una muestra de tumor gástrico del tipo intersticial, las células tumorales (flechas) muestran algo de tinción usando el anticuerpo αFGFR2b, mientras que las células ductales circundantes no muestran tinción. En la Figura 11C, la cual muestra una muestra de tumor gástrico de del tipo difuso, las células tumorales (flechas) muestran algo de tinción usando el anticuerpo αFGFR2b, mientras que las células estromales circundantes (puntas de flecha) no muestran tinción. En la Figura 11D, las células tumorales (flechas) muestran tinción intermedia usando el anticuerpo αFGFR2b, mientras que las células estromales circundantes (puntas de flecha) no muestran tinción. In la Figura 11E, las células tumorales (flechas) muestran alta tinción localizada en la membrana usando el anticuerpo αFGFR2b, mientras que las células estromales circundantes (puntas de flecha) no muestran tinción. En la Figura 11F, las células tumorales (flechas) muestran tinción de membrana/citoplasma alta usando el anticuerpo αFGFR2b, mientras que las células estromales circundantes (puntas de flecha) no muestran tinción.

TABLA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia		
1	FGFR2IIb humano maduro	RPSFSLVED	TTLEPEEPPT	KYQISQPEVY
		VAAPGESLEV		
		RCLLKDAAVI	SWTKDGVHLG	PNNRTVLIGE
		YLQIKGATPR	DSGLYACTAS	RTVDSETWYF
		MVNVTDAISS	GDDEDDTDGA	EDFVSENSNN
		KRAPYWTNTE	KMEKRLHAVP	AANTVKFRCP
		AGGNPMPTMR	WLKNGKEFKQ	EHRIGGYKVR
		NQHWSLIMES	VVPSDKGNYT	CVVENEYGSI
		NHTYHLDVVE	RSPHRPILQA	GLPANASTVV
		GGDVEFVCKV	YSDAQPHIQW	IKHVEKNGSK
		YGPDGLPYLK	VLKHSGINSS	NAEVLALFNV
		TEADAGEYIC	KVSNYIGQAN	QSAWLTVLPK
		QQAPGREKEI	TASPDYLEIA	IYCIGVFLIA
		CMVVTVILCR	MKNTTKKPDF	SSQPAVHKLT
		KRIPLRRQVT	VSAESSSSMN	SNTPLVRITT
		RLSSTADTPM	LAGVSEYELP	EDPKWEFPRD
		KLTLGKPLGE	GCFGQVMAE	AVGIDKDKPK
		EAVTVAVKML	KDDATEKDLS	DLVSEMEMMK

		MIGKHKNIIN GNLREYLRAR FKDLVSCTYQ RNVLVTENNV TTNGRLPVKW GVLMWEIFTL HRMDKPANCT FKQLVEDLDR SPSYPDTRSS PQYPHINGSV	LLGACTQDGP RPPGMEYSYD LARGMEYLAS MKIADFGLAR MAPEALFDRV GGSPYPGIPV NELYMMMRDC ILTTLTNEEY CSSGDDSVFS KT	LYVIVEYASK INRVPEEQMT QKCIHRDLAA DINNIDYYKK YTHQSDVWSF EELFKLLKEG WHAVPSQRPT LDLSQPLEQY PDPMPYEPCL
2	Cadena pesada de α FGFR2b; el Asn297 está en negritas y subrayado	QVQLVQSGAE TYNVHWVRQA NQNFKGRATI TAVYYCARGD SVFPLAPSSK VTVSWNSGAL SVVTVPSSSL RVEPKSCDKT PPKPKDTLMI KFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMHEALH	VKKPGSSVKV PGQGLEWIGS TADKSTSTAY FAYWGQGTLV STSGGTAALG TSGVHTFPAV GTQTYICNVN HTCPPCPAPE SRTPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYKCKV REPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSKLTVD NHYTQKSLSL	SCKASGYIFT IYPDNGDTSY MELSSLRSED TVSSASTKGP CLVKDYFPEP LQSSGLYSL HKPSNTKVDK LLGGPSVFLF VDVSHEDPEV EQYNSTYRVV SNKALPAPIE SREEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQQGNVF SPGK
3	Cadena ligera de α FGFR2b	DIQMTQSPSS NDVAWYQQKP RFSGSGSGTD HSTTPYTFGQ SDEQLKSGTA DNALQSGNSQ LSKADYEKHK RGEC	LSASVGDRV GKAPKLLIYS FTFTISSLQP GTKLEIKRTV SVVCLLNNFY ESVTEQDSKD VYACEVTHQG	ITCKASQGV ASYRYTGVP EDIATYYCQ AAPSVFIFPP PREAKVQWK STYSLSSSTLT LSSPVTKSFN
4	Región variable de cadena pesada de α FGFR2b	QVQLVQSGAE TYNVHWVRQA NQNFKGRATI TAVYYCARGD	VKKPGSSVKV PGQGLEWIGS TADKSTSTAY FAYWGQGTLV	SCKASGYIFT IYPDNGDTSY MELSSLRSED TVSS
5	Región variable de cadena ligera de α FGFR2b	DIQMTQSPSS NDVAWYQQKP RFSGSGSGTD HSTTPYTFGQ	LSASVGDRV GKAPKLLIYS FTFTISSLQP GTKLEIK	ITCKASQGV ASYRYTGVP EDIATYYCQ
6	Cadena pesada de α FGFR2b (HC) HVR1	TYNVH		
7	α FGFR2b HC HVR2	SIYPDNGDTS	YNQNFKG	
8	α FGFR2b HC HVR3	GDFAY		
9	Cadena ligera de α FGFR2b (LC) HVR1	KASQGVSN	DA	
10	α FGFR2b LC HVR2	SASYRYT		
11	α FGFR2b LC HVR3	QQHSTTPYT		
12	FGFR2IIIC	RPSFSLVED	TTLEPEEPPT	KYQISQPEVY

humano maduro	VAAPGESLEV		
	RCLLKDAAVI	SWTKDGVHLG	PNNRTVLIGE
	YLQIKGATPR	DSGLYACTAS	RTVDSETWYF
	MVNVTDAISS	GDDEDDTDGA	EDFVSENSNN
	KRAPYWTNTE	KMEKRLHAVP	AANTVKFERCP
	AGGNPMP TMR	WLKNGKEFKQ	EHRIGGYKVR
	NQHWSLIMES	VVPSDKGNYT	CVVENEYGSI
	NHTYHLDVVE	RSPHRPILQA	GLPANASTVV
	GGDVEFVCKV	YSDAQPHIQW	IKHVEKNGSK
	YGPDGLPYLK	VLKAAGVNTT	DKEIEVLYIR
	NVTFEDAGEY	TCLAGNSIGI	SFHSAWLTVL
	PAPGREKEIT	ASPDYLEIAI	YCIGVFLIAC
	MVVTVILCRM	KNTTKKPDFS	SQPAVHKLTK
	RIPLRRQVTV	SAESSSSMNS	NTPLVRITTR
	LSSTADTPML	AGVSEYELPE	DPKWEFPRDK
	LTLGKPLGEG	CFGQVMAEA	VGIDKDKPKE
	AVTVAVKMLK	DDATEKDLSD	LVSEMEMMKM
	IGKHKNIINL	LGACTQDGPL	YVIVEYASKG
	NLREYLRARR	PPGMEYSYDI	NRVPEEQMTF
	KDLVSCTYQL	ARGMEYLASQ	KCIHRDLAAR
	NVLVTENNVN	KIADFG LARD	INNIDYYKKT
	TNGRLPVKWM	APEALFDRVY	THQSDVWSFG
	VLMWEIFTLG	GSPYPGIPVE	ELFKLLKEGH
	RMDKPANCTN	ELYMMMRDCW	HAVPSQRPTF
	KQLVEDLDRI	LTLTTNEEYL	DLSQPLEQYS
	PSYPDTRSSC	SSGDDSVFSP	DPMPYEPCLP
	QYPHINGSVK	T	

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos anti-FGFR2IIIb, donde cada anticuerpos anti-FGFR2IIIb comprende regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

(ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y

(iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

y la región variable de cadena ligera comprende:

(iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;

(v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y

(vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;

donde al menos 95% de los anticuerpos anti-FGFR2IIIb en la composición están afucosilados.

2. La composición de la reivindicación 1, donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

4. La composición de la reivindicación 1, donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

7. La composición de la reivindicación 1, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera

comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

8. Una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados, donde los anticuerpos anti-FGFR2IIIb compiten por la unión a FGFR2IIIb con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde los anticuerpos son anticuerpos quiméricos.

11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los anticuerpos son anticuerpos humanizados.

12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los anticuerpos carecen de fucosa en Asn297.

13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los anticuerpos comprenden una región constante de cadena ligera κ .

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde los anticuerpos comprenden una región constante de cadena pesada IgG1.

15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde los anticuerpos afucosilados tienen actividad de ADCC mejorada *in vitro* comparados con un anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado que tiene la misma secuencia de aminoácidos.

16. La composición de la reivindicación 15, donde los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados causan una lisis específica que es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 65, al menos 70, o al menos 75 puntos porcentuales mayor que la lisis específica con el anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado.

17. La composición de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, donde la actividad de ADCC es determinada usando células Ba/F3 que expresan FGFR2IIIb como células blanco y PBMCs humanas aisladas como células efectoras.

18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde los anticuerpos afucosilados tienen afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA comparados con un anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado que tiene la misma

secuencia de aminoácidos.

19. La composición de la reivindicación 18, donde los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados se unen a Fc gamma RIIIA con al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 17 veces, o al menos 20 veces mayor afinidad que el anticuerpo anti-FGFR2IIIb fucosilado.

20. La composición de la reivindicación 18 y la reivindicación 19, donde la afinidad por Fc gamma RIIIA es determinada usando resonancia plasmónica superficial.

21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde el Fc gamma RIIIA es seleccionado de Fc gamma RIIIA(V158) y Fc gamma RIIIA(F158).

22. La composición de la reivindicación 21, donde el Fc gamma RIIIA es Fc gamma RIIIA(V158).

23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, donde los anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados se unen a FGFR2IIIb pero no se unen a FGFR2IIIc.

24. Una célula anfitriona que comprende ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-FGFR2IIIb de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde la célula anfitriona carece de un gen de alfa-1.6-fucosiltransferasa funcional (gen FUT8).

25. La célula anfitriona de la reivindicación 24, la cual es una célula CHO.

26. Un método para producir anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados, el método comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 24 o la reivindicación 25 bajo condiciones adecuadas para expresar el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-FGFR2IIIb.

27. Un método para producir anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados, que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 24 o la reivindicación 25 bajo condiciones adecuadas para producir anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados.

28. El método de la reivindicación 26 o 27, que comprende además recuperar el anticuerpo anti-FGFR2IIIb producido por la célula anfitriona.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26 to 28, donde al menos 95% de los anticuerpos anti-FGFR2IIIb producido por la célula anfitriona están afucosilados.

30. El método de la reivindicación 29, donde la fucosa es indetectable en los anticuerpos anti-FGFR2IIIb producidos por la célula anfitriona.

31. El método de la reivindicación 29 o la reivindicación 30, donde la fucosa es detectada por un método que comprende HPLC, electroforesis capilar, o espectrometría de masas MALDI-TOF.

32. Una composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y un portador farmacéuticamente aceptable.

33. Un método de tratamiento del cáncer en un individuo que comprende administrar a un individuo con cáncer una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la reivindicación 32.

34. El método de la reivindicación 33, donde el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, y cáncer esofágico.

35. El método de la reivindicación 34, donde el cáncer es cáncer gástrico.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 to 35, donde el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb.

37. El método de la reivindicación 36, donde la expresión de FGFR2IIIb es determinada por inmunohistoquímica (IHC).

38. El método de la reivindicación 36 o la reivindicación 37, donde el cáncer no comprende la amplificación del gen de FGFR2.

39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 to 37, donde el cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 to 39, donde el método comprende además administrar al menos un agente terapéutico adicional seleccionado de un agente de platino, paclitaxel, ABRAXANE®, docetaxel, gemcitabina, capecitabina, irinotecano, epirrubicina, FOLFOX, FOLFIRI, leucovorina, fluorouracilo, mitomicina C, y clorhidrato de doxorubicina.

41. El método de la reivindicación 40, donde el agente de platino es seleccionado de cisplatino, oxaliplatino, y carboplatino.

42. El método de la reivindicación 41, donde el agente terapéutico adicional es paclitaxel.

43. El método de la reivindicación 41, donde el agente terapéutico adicional es cisplatino y/o 5-FU.

44. Uso de una composición farmacéutica de la reivindicación 32

para tratar el cáncer en un individuo que necesita de la misma.

45. El uso de la reivindicación 44, donde el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, o cáncer esofágico.

46. El uso de la reivindicación 45, donde el cáncer es cáncer gástrico.

47. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 44 to 46, donde el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb.

48. El uso de la reivindicación 47, donde la expresión de FGFR2IIIb es determinada por inmunohistoquímica (IHC).

49. El uso de la reivindicación 47 o la reivindicación 48, donde el cáncer no comprende la amplificación del gen de FGFR2.

50. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 42 to 48, donde el cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2.

51. Una composición farmacéutica para tratar el cáncer en un individuo que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-FGFR2IIIb de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y un portador farmacéuticamente aceptable.

52. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, donde el cáncer es seleccionado de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer pancreático, y cáncer esofágico.

53. La composición farmacéutica de la reivindicación 52, donde el cáncer es cáncer gástrico.

54. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 51 to 53, donde el cáncer sobreexpresa FGFR2IIIb.

55. La composición farmacéutica de la reivindicación 54, donde la expresión de FGFR2IIIb es determinada por inmunohistoquímica (IHC).

56. La composición farmacéutica de la reivindicación 54 o la reivindicación 55, donde el cáncer no comprende la amplificación del gen de FGFR2.

57. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 51 to 54, donde el cáncer comprende una amplificación del gen de FGFR2.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a FGFR2IIIb, donde los anticuerpos están afucosilados. La presente invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos que se unen a FGFR2IIIb, donde al menos 95% de los anticuerpos en la composición están afucosilados. En algunas modalidades, son proporcionados métodos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar anticuerpos anti-FGFR2IIIb afucosilados.

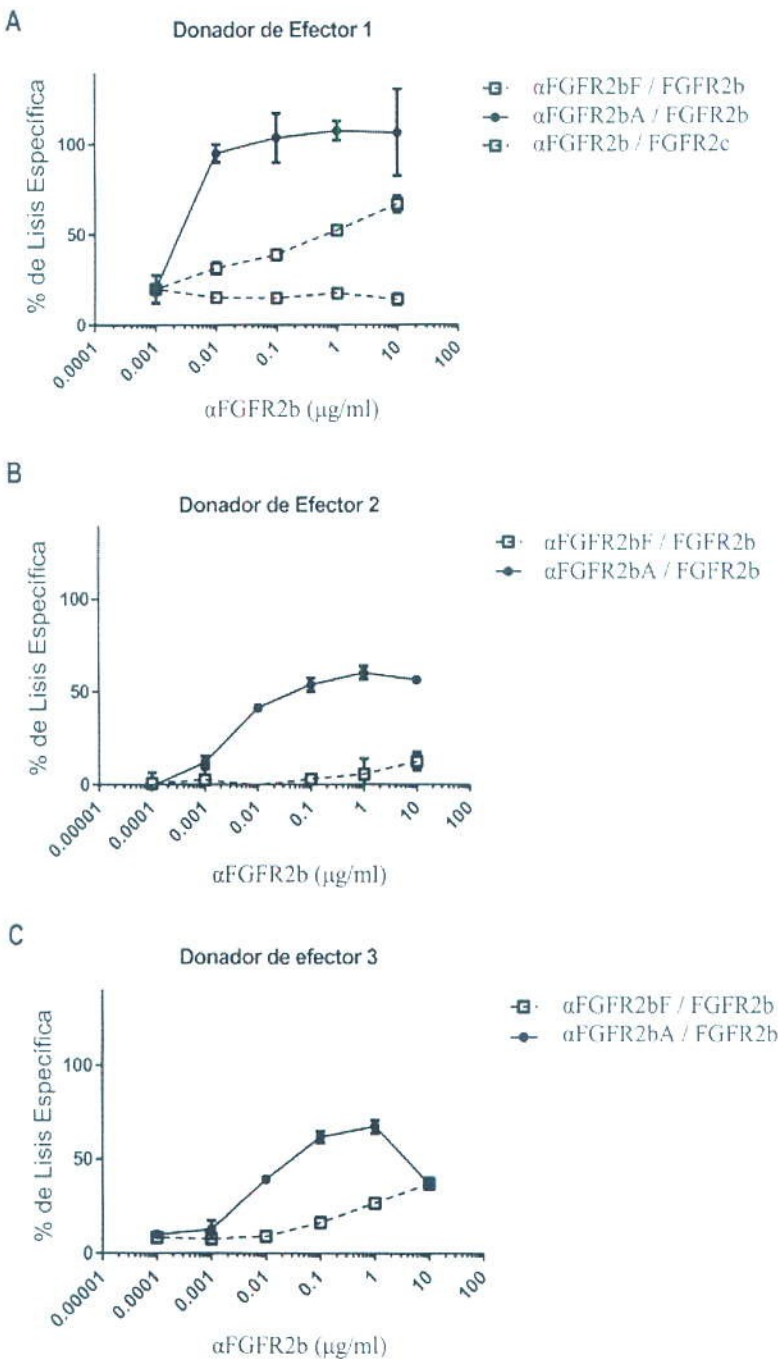


FIG. 1

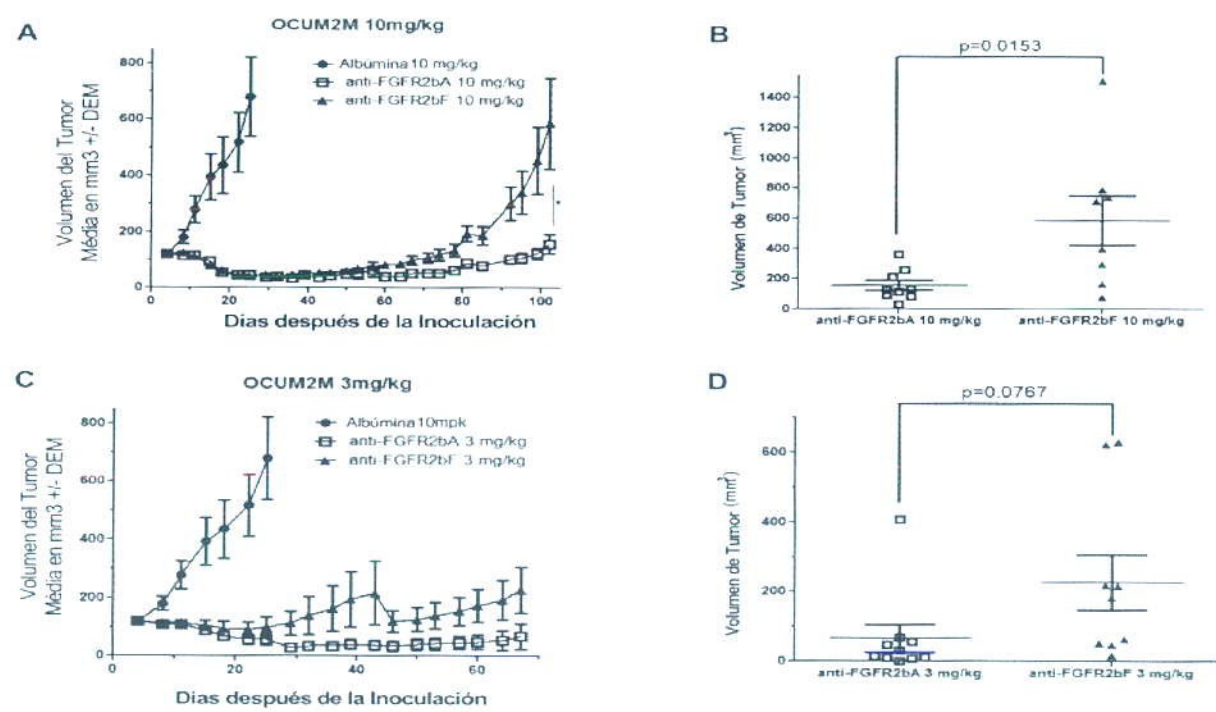


FIG. 2

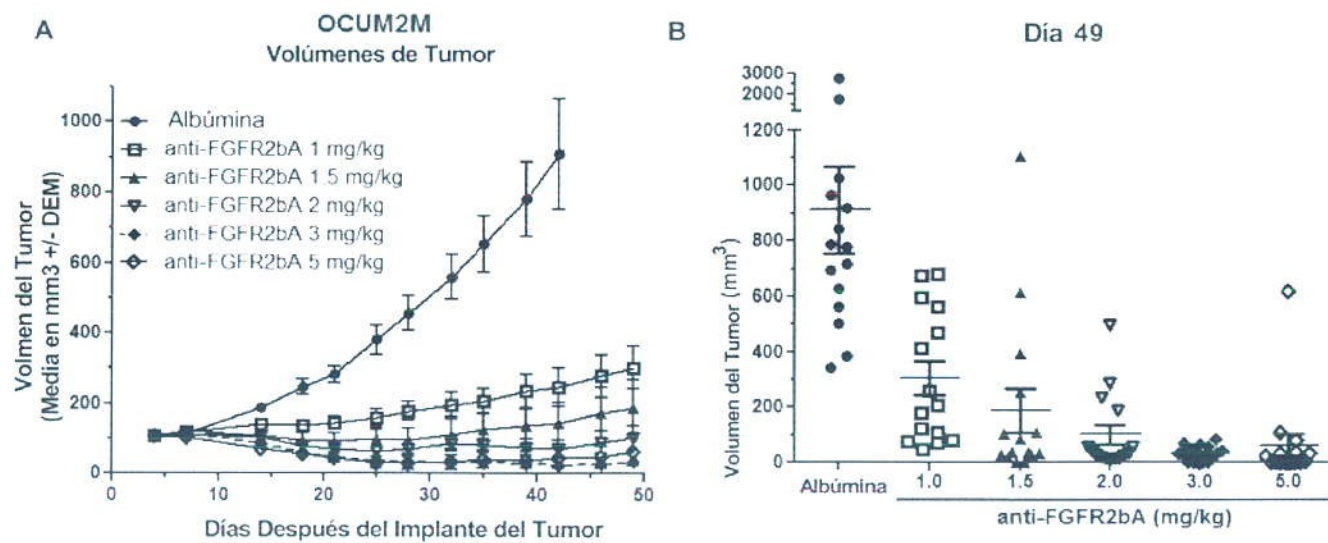
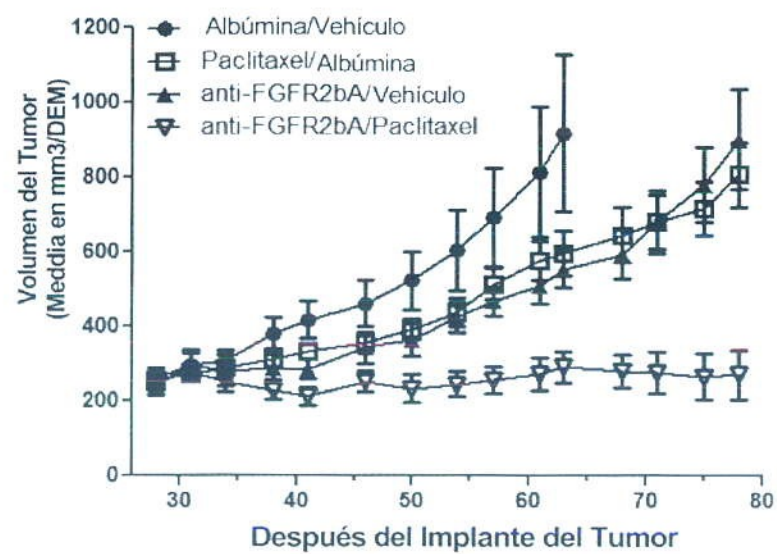


FIG. 3

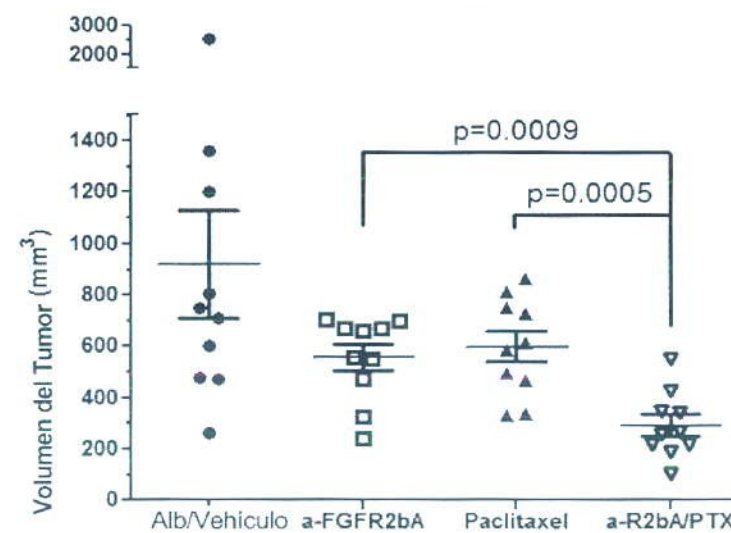
A

OCUM-2Mv1



B

Día 63



4/10

FIG. 4

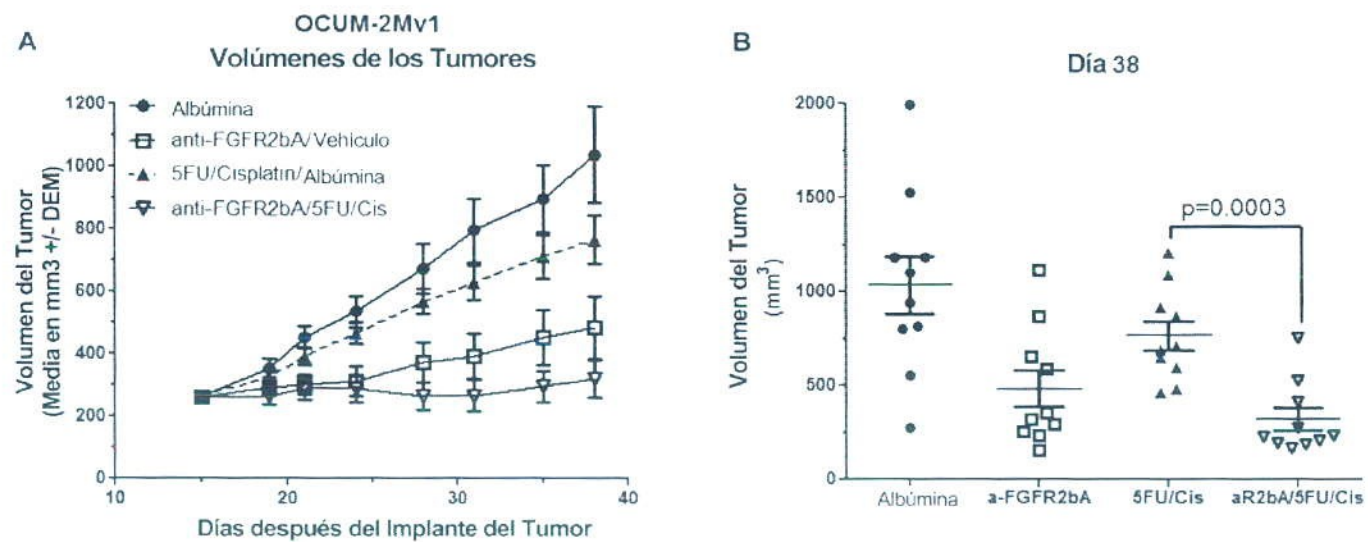


FIG. 5

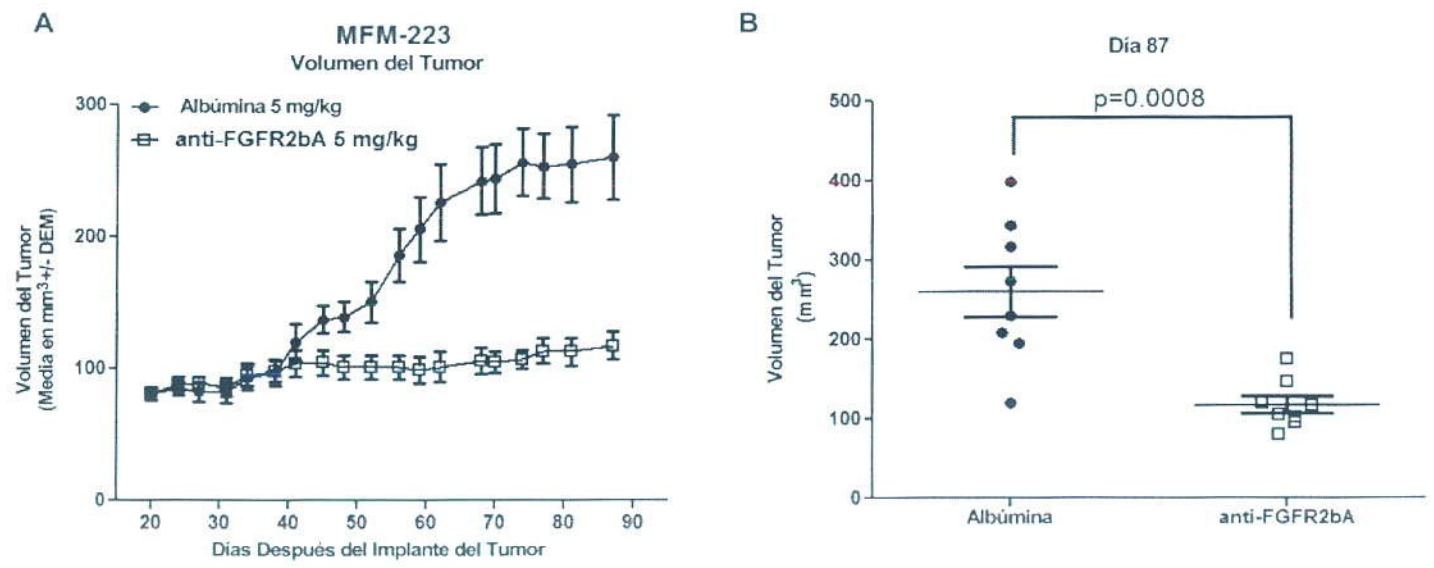


FIG. 6

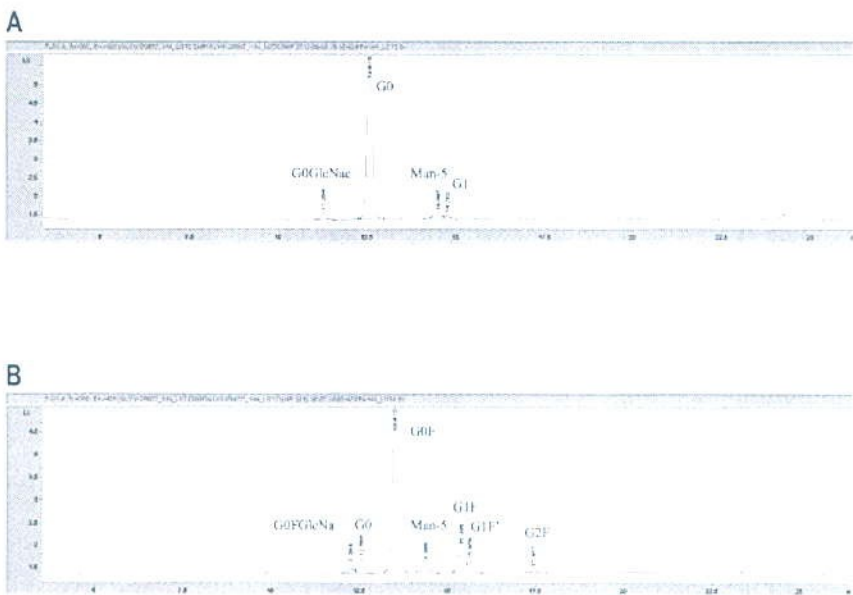


FIG. 7

8/10

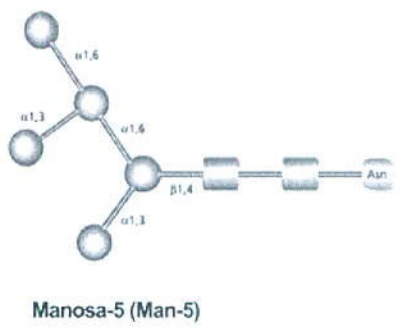
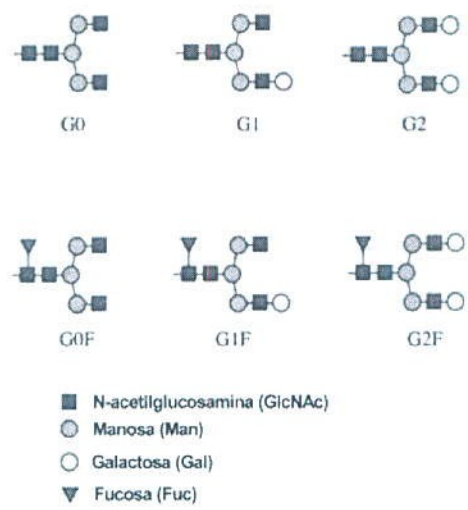


FIG. 8

Ba/F3 FGFR2b ADCC: Donador 9

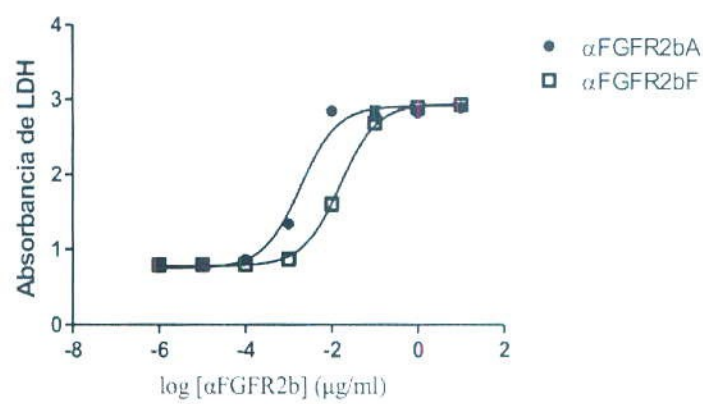


FIG. 9

OCUM-2M ADCC: Donador 9

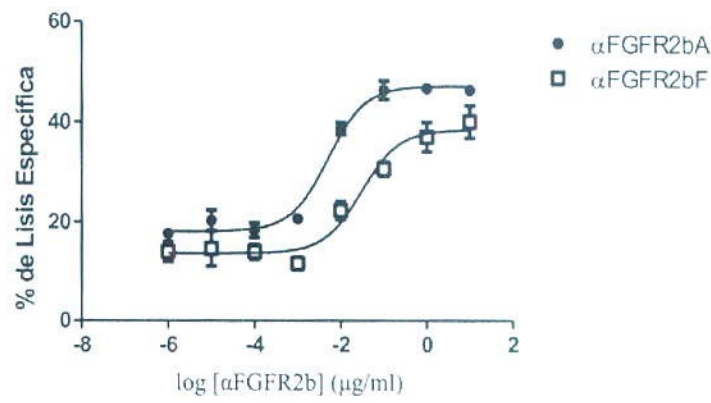


FIG. 10

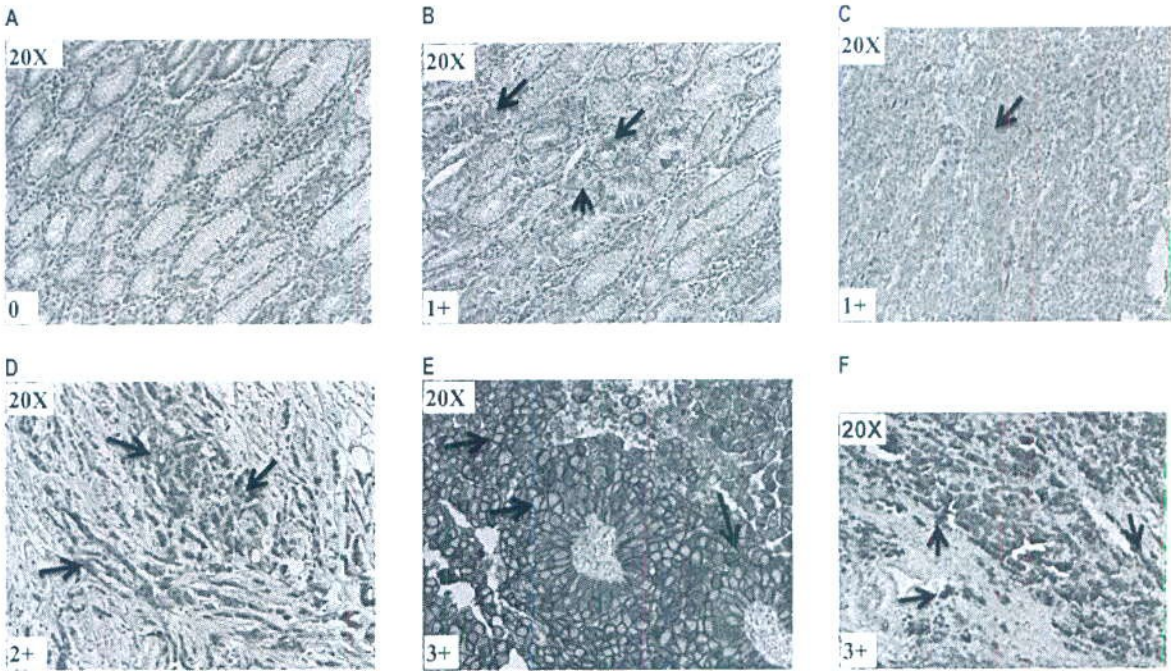


FIG. 11

Brigard & Castro

BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), **FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.**

domiciliado(s) en Two Corporate Drive, South San Francisco, California 94080 US.

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, lemas comerciales, nombres comerciales, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas, acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) facuto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley, renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la calle 70A No. 4-41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 20__

Firma

Nombre

Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We), **FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.**

domiciled in Two Corporate Drive, South San Francisco, California 94080, US.

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind, to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages, claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in calle 70A No. 4-41, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

this 20 day of October, 2015


Signature

Name: Francis Sarena

Title: Executive Vice President, General Counsel,
and Secretary



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

SEPTEMBER 6, 2013

PTAS

REBECCA B. SCARR
2275 DEMING WAY, STE 310
MIDDLETON, WI 53562

502484035

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 09/05/2013

REEL/FRAME: 031143/0583
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: FPT-33453/US-1/PRO

ASSIGNOR:
HARDING, THOMAS

DOC DATE: 09/05/2013

ASSIGNOR:
PIERCE, KRISTEN

DOC DATE: 09/05/2013

ASSIGNOR:
PATIL, NAMRATA

DOC DATE: 09/05/2013

ASSIGNOR:
BRENNAN, THOMAS

DOC DATE: 09/05/2013

ASSIGNOR:
HAMBLETON, JULIE

DOC DATE: 09/04/2013

ASSIGNEE:
FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.
TWO CORPORATE DRIVE
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

9A

031143/0583 PAGE 2

APPLICATION NUMBER: 61861198 FILING DATE: 08/01/2013
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

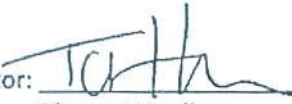
WHEREAS, WE, Thomas Harding, Kristen Pierce, Namrata Patil, Thomas Brennan, and Julie Hambleton, hereinafter referred to as "ASSIGNORS," have invented certain new and useful improvements as described and set forth in the below-identified application for United States Letters Patent:

Title of Invention: **AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES**
Filing Date: **08/01/2013** Serial No.: **61/861,198**

WHEREAS, Five Prime Therapeutics, a corporation organized and existing under the laws of Delaware, having a place of business at Two Corporate Drive, San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNEE," is desirous of acquiring the entire right, title and interest in said invention and application and in any Letters Patent which may be granted on the same;

NOW THEREFORE, TO ALL WHOM IT MAY CONCERN: Be it known that, ASSIGNOR has sold, assigned and transferred, and by these presents does sell, assign and transfer unto said ASSIGNEE, and ASSIGNEE's successors and assigns, all right, title and interest in and to said invention, said application for United States Letters Patent, and any Letters Patent which may hereafter be granted on the same in the United States and all countries throughout the world, including any divisions, renewals, continuations in whole or in part, substitutions, conversions, reissues, or prolongations or extensions thereof, said interest to be held and enjoyed by said ASSIGNEE as fully and exclusively as it would have been held and enjoyed by said ASSIGNOR had this assignment and transfer not been made, to the full extent and term of any Letters Patent.

ASSIGNOR further agrees that ASSIGNOR will, without charge to said ASSIGNEE, but at ASSIGNEE's expense, cooperate with ASSIGNEE in the prosecution of said application and/or applications; execute, verify, acknowledge, and deliver all such further papers, including applications for Letters Patent and for the reissue thereof, and instruments of assignment and transfer thereof; and perform such other acts as ASSIGNEE lawfully may request, to obtain or maintain Letters Patent for said invention and improvement in any and all countries, and to vest title thereto in said ASSIGNEE, or ASSIGNEE's successors and assigns.

Inventor: <u></u>	Date: <u>9/5/2013</u>
Thomas Harding	
Inventor: _____	Date: _____
Kristen Pierce	
Inventor: _____	Date: _____
Namrata Patil	
Inventor: _____	Date: _____
Thomas Brennan	
Inventor: _____	Date: _____
Julie Hambleton	

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, Thomas Harding, Kristen Pierce, Namrata Patil, Thomas Brennan, and Julie Hambleton, hereinafter referred to as "ASSIGNORS," have invented certain new and useful improvements as described and set forth in the below-identified application for United States Letters Patent:

Title of Invention: **AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES**
Filing Date: **08/01/2013** Serial No.: **61/861,198**

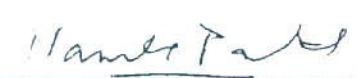
WHEREAS, Five Prime Therapeutics, a corporation organized and existing under the laws of Delaware, having a place of business at Two Corporate Drive, San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNEE," is desirous of acquiring the entire right, title and interest in said invention and application and in any Letters Patent which may be granted on the same;

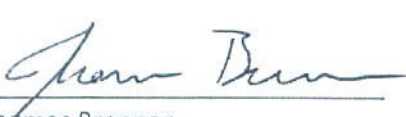
NOW THEREFORE, TO ALL WHOM IT MAY CONCERN: Be it known that, ASSIGNOR has sold, assigned and transferred, and by these presents does sell, assign and transfer unto said ASSIGNEE, and ASSIGNEE's successors and assigns, all right, title and interest in and to said invention, said application for United States Letters Patent, and any Letters Patent which may hereafter be granted on the same in the United States and all countries throughout the world, including any divisions, renewals, continuations in whole or in part, substitutions, conversions, reissues, or prolongations or extensions thereof, said interest to be held and enjoyed by said ASSIGNEE as fully and exclusively as it would have been held and enjoyed by said ASSIGNOR had this assignment and transfer not been made, to the full extent and term of any Letters Patent.

ASSIGNOR further agrees that ASSIGNOR will, without charge to said ASSIGNEE, but at ASSIGNEE's expense, cooperate with ASSIGNEE in the prosecution of said application and/or applications; execute, verify, acknowledge, and deliver all such further papers, including applications for Letters Patent and for the reissue thereof, and instruments of assignment and transfer thereof; and perform such other acts as ASSIGNEE lawfully may request, to obtain or maintain Letters Patent for said invention and improvement in any and all countries, and to vest title thereto in said ASSIGNEE, or ASSIGNEE's successors and assigns.

Inventor: _____ Date: _____
Thomas Harding

Inventor:  Date: 9/5/13
Kristen Pierce

Inventor:  Date: 9/5/13
Namrata Patil

Inventor:  Date: 9/5/13
Thomas Brennan

Inventor: _____ Date: _____
Julie Hambleton

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, Thomas Harding, Kristen Pierce, Namrata Patil, Thomas Brennan, and Julie Hambleton, hereinafter referred to as "ASSIGNORS," have invented certain new and useful improvements as described and set forth in the below-identified application for United States Letters Patent:

Title of Invention: AFUCOSYLATED ANTI-FGFR2IIIB ANTIBODIES
Filing Date: 08/01/2013 Serial No.: 61/861,198

WHEREAS, Five Prime Therapeutics, a corporation organized and existing under the laws of Delaware, having a place of business at Two Corporate Drive, San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNEE," is desirous of acquiring the entire right, title and interest in said invention and application and in any Letters Patent which may be granted on the same;

NOW THEREFORE, TO ALL WHOM IT MAY CONCERN: Be it known that, ASSIGNOR has sold, assigned and transferred, and by these presents does sell, assign and transfer unto said ASSIGNEE, and ASSIGNEE's successors and assigns, all right, title and interest in and to said invention, said application for United States Letters Patent, and any Letters Patent which may hereafter be granted on the same in the United States and all countries throughout the world, including any divisions, renewals, continuations in whole or in part, substitutions, conversions, reissues, or prolongations or extensions thereof, said interest to be held and enjoyed by said ASSIGNEE as fully and exclusively as it would have been held and enjoyed by said ASSIGNOR had this assignment and transfer not been made, to the full extent and term of any Letters Patent.

ASSIGNOR further agrees that ASSIGNOR will, without charge to said ASSIGNEE, but at ASSIGNEE's expense, cooperate with ASSIGNEE in the prosecution of said application and/or applications; execute, verify, acknowledge, and deliver all such further papers, including applications for Letters Patent and for the reissue thereof, and instruments of assignment and transfer thereof; and perform such other acts as ASSIGNEE lawfully may request, to obtain or maintain Letters Patent for said invention and improvement in any and all countries, and to vest title thereto in said ASSIGNEE, or ASSIGNEE's successors and assigns.

Inventor: _____ Date: _____
Thomas Harding

Inventor: _____ Date: _____
Kristen Pierce

Inventor: _____ Date: _____
Namrata Patil

Inventor: _____ Date: _____
Thomas Brennan

Inventor:  _____ Date: 09/04/2013
Julie Hambleton

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A **FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.** firmado por los cedentes y el cesionario.

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS
 Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

06 de septiembre de 2013

PTAS

REBECCA B. SCARR
 2275 Deming Way, Ste 310
 Middleton, WI 53562

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos
 Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 09/05/2013

Rollo/Cuadro: 031143/0583
 Número de páginas: 5

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)
 Número de Expediente de Abogado: FPT-33453/US-1/PRO

Cedente:
 HARDING, THOMAS

Fecha del Documento: 09/05/2013

Cedente:
 PIERCE, KRISTEN

Fecha del Documento: 09/05/2013

Cedente:
 PATIL, NAMRATA

Fecha del Documento: 09/05/2013

Cedente:
 BRENNAN, THOMAS

Fecha del Documento: 09/05/2013

Cedente:
 HAMBLETON, JULIE

Fecha del Documento: 09/05/2013

Cesionario:
 FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.
 Two Corporate Drive
 South San Francisco, California
 94080

Número de solicitud: 61861198
 Número de patente:
 Título: ANTICUERPOS ANTI-FGFR2IIIB AFUCOSILADOS

Fecha de presentación: 08/01/2013
 Fecha de expedición:

SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES
 DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

Patente
Expediente de Abogado No. FPT-33453/US-1/PRO

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE NOSOTROS, **Thomas Harding, Kristen Pierce, Namrata Patil, Thomas Brennan y Julie Hambleton**, en adelante referidos como "CEDENTES", hemos inventado ciertas mejoras novedosas y útiles como se describe y establece en la solicitud para Título de Patentes de los Estados Unidos identificada abajo:

Título de la invención: ANTICUERPOS ANTI-FGFR2IIIB AFUCOSILADOS
Fecha de presentación: 08 de enero de 2013 **Número serial: 61/861,198**

CONSIDERANDO QUE, FIVE PRIME THERAPEUTICS, una corporación de Delaware, que tiene oficinas en Two Corporate Drive, South San Francisco, California 94080, en adelante referida como "CESIONARIA" está deseosa de adquirir el derecho, título e interés total en dicha invención y solicitud y en cualquier Título de Patentes que se pueda otorgar sobre la misma;

AHORA, POR LO TANTO, A TODO EL QUE PUEDA INTERESARLE: sépase que el CEDENTE ha vendido, cedido y transferido, y por la presente vende, cede y transfiere a dicho CESIONARIO, y sucesores y designados del CESIONARIO, todo el derecho, título e interés en y para dicha invención, dicha solicitud para Título de Patentes de los Estados Unidos, y cualquier Título de Patentes que pueda ser otorgado a partir de esta sobre la misma en los Estados Unidos y todos los países alrededor del mundo, incluida cualquier divisional, renovación, continuación completa o en parte, sustituciones, conversiones, reexpediciones, prolongaciones o extensiones de la misma, dicho interés a ser de propiedad y disfrutado por dicho CESIONARIO de forma completa y exclusiva como hubiera sido de propiedad y disfrutado por dicho CEDENTE si esta cesión y transferencia no se hubieran llevado a cabo, hasta el alcance y término final de cualquier Título de Patentes.

El CEDENTE además acuerda que el CEDENTE cooperará, sin cobro a dicho CESIONARIO pero a expensas del CESIONARIO, con el CESIONARIO en la consecución de dicha solicitud y/o solicitudes; ejecutará, verificará, reconocerá y entregará todos los demás documentos, incluidas las solicitudes para Título de Patentes y para la reexpedición de las mismas, e instrumentos de la cesión y transferencia de la misma, y llevará a cabo todos los demás actos que el CESIONARIO pueda legalmente solicitar para obtener o mantener el Título de Patentes para dicha invención y mejora en cualquier y todos los países y otorgará el título para el mismo en dicho CESIONARIO, o sucesores y designados del CESIONARIO.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, el CEDENTE ha firmado en el presente el nombre del CEDENTE para esta cesión en la fecha indicada abajo:

Inventor: _____ (firma)
Thomas Harding

Fecha: 09/05/2013

Inventor: _____ (firma)
Kristen Pierce

Fecha: 09/05/2013

Inventor: _____ (firma)
Namrata Patil

Fecha: 09/05/2013

Inventor: _____ (firma)
Thomas Brennan

Fecha: 09/05/2013

Inventor: _____ (firma)
Julie Hambleton

Fecha: 09/05/2013

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

135461
100

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 000177

Bogotá D.C., Enero 05 de 2016 - 08:02:48

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	706136701	30/12/2015	146.485.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
150005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	80.000.00	80.000.00
				\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-050106- -00000-0000

Fecha: 2016-02-26 16:05:29 Dep: 2020 DIR NUEVASOR
Tra: 11 PATENTLIYII Eve: 378 FASLNACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 101

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 5 de 2016 - 08:03:12



No. 16-050106- -00000-0000

Fecha 2016-02-26 16:05:29
Tra: 11 PATENTE IYI
Act: 411 PRESENTACION

Dep: 2020 DIR NULVASCR
Lve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 101

s 101

PATENTE DE INVENCION ☐

MODEL

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐