



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 917**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04796034 .9**

96 Fecha de presentación : **18.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1680140**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54

Título: **Inhibidores del receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos y procedimiento de tratamiento de los mismos.**

30

Prioridad: **16.10.2003 US 512255 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

73

Titular/es: **ImClone L.L.C.**
180 Varick Street
New York, New Yory 10014, US

72

Inventor/es: **Sun, Haijun;**
Shen, Juqun y
Tonra, James, R.

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 917 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Inhibidores del receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos y procedimientos de tratamiento de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo, o fragmento del mismo, que es específico para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc). La presente invención proporciona además procedimientos de antagonización y neutralización del FGFR-1 y FGFR-4 como un tratamiento para la obesidad, diabetes, y/o un estado relacionado con las mismas, que incluye la reducción de la ingesta de alimentos o de la masa corporal total.

Antecedentes de la invención

Las vías del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) están en general implicadas en muchos procesos fisiológicos, tales como la morfogénesis durante el desarrollo y la angiogénesis que es el proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que implica la proliferación, migración, e infiltración de tejidos de células endoteliales capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes. Los FGFs son algunos de los factores que han sido implicados como posibles reguladores de la angiogénesis conjuntamente con el factor de crecimiento de transformación (TGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y el factor de crecimiento obtenido de plaquetas (PDGF). Igualmente, las vías del FGF están implicadas en la supervivencia neuronal y la curación de heridas. Igualmente, se estima que son importantes en un cierto número de procesos patológicos.

En particular, el FGFR-1 se le ha implicado como involucrado en enfermedades tales como cánceres y artritis. Aunque se ha sugerido la implicación de las vías del FGF en el metabolismo, tal como el comportamiento alimentario y desarrollo de tejido adiposo, no está claro si estos hallazgos implican mecanismos fundamentales a través de los cuales se regula el metabolismo. Por ejemplo, un reciente estudio realizado en ratones ha mostrado que inyecciones del FGF-2, en combinación con proteínas de membranas basales, puede inducir el desarrollo de nuevo tejido adiposo en el sitio de la inyección. Esto sugiere que los FGFs producidos localmente pueden actuar de una manera paracrina para afectar a la adipogénesis y, en consecuencia, influir en la distribución regional de tejido adiposo en el cuerpo y en la relación entre tejido adiposo y resistencia a la insulina está bien establecida, estando ambas fuertemente implicadas en la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular.

Los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs) tienen características estructurales comunes y están constituidos por un dominio de unión de ligando extracelular que contiene 2 ó 3 hélices tipo Ig y una única región ácido, un dominio trans-membrana, y la región citoplásmica, la cual contiene el dominio catalítico tirosina quinasa y el inserto quinasa. Los FGFRs pertenecen a la Subclase IV del receptor tirosina quinasa de la familia de proteínas. Estos receptores se unen de acuerdo con un patrón de solapamiento con los FGFs. Se ha establecido que 22 FGFs actúan sobre 5 FGFRs en interacción paracrina de ligando del FGF.

El FGFR-1 tiene dos formas de corte y empalme alternativas que difieren entre sí por las substituciones de aminoácidos en el tercer dominio tipo IgG de la estructura extracelular del receptor designado IIIb y IIIc. El FGFR-4 tiene solamente una. Estas substituciones constituyen lo que se estima que es parte del dominio de unión del receptor y, en consecuencia, son lo más probablemente la causa de que las dos formas de corte y empalme tengan distintas especificidades de ligandos. Igualmente, se ha mostrado que las dos formas están expresadas de manera diferencial, lo cual puede ser parte de un mecanismo de control exquisito de funciones complejas mediadas por el FGFR-1.

La unión de ligandos, la cual está fortalecida por la presencia de sulfato de heparina, da lugar a que los FGFRs se dimericen y activen vías de señales intracelulares específicas (Bellot y otros, 1991). El receptor se transforma en auto-fosforilado y, de esta forma, es capaz de activar vías celulares más abajo. Entre diferentes respuestas celulares, la estimulación de la proliferación o la inducción de diferenciación son las más comúnmente observadas para señales mediadas por el FGFR-1.

En la técnica se conocen diversos anticuerpos que unen y neutralizan la activación del receptor FGFR-1 (Patente WO 02/102973; Prochon Biotech Ltd.) (Blanckaert y otros "Partial characterization of endotelial FGF receptor functional domain by monoclonal antibody VBS-1", Hybridoma and Hybridomics, vol. 21, nº. 3, págs. 153-159, (2002)).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de los mismos, específicos para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), así como ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos o fragmentos de los mismos. Igualmente, se proporcionan vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células huéspedes para la producción de estos anticuerpos.

La presente invención proporciona además un uso de un antagonista del FGFR-1(IIIc) y FGF-4(IIIc) en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la obesidad, un estado resultante de o agravado por la obesidad, diabetes, o un estado resultante de o agravado por la diabetes, en la que el antagonista es un anticuerpo de la invención o fragmento del mismo.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de las regiones variables y las CDRs del FR1-H7. La Figura 1A muestra las secuencias de aminoácidos y de ADN de la región variable de la cadena pesada del FR1-H7 (SEC ID NOS: 7 y 31). La Figura 1B muestra las secuencias de aminoácidos y de ADN de la región variable de la cadena ligera del FR1-H7 (SEC ID NOS: 8 y 32). La Figura 1C muestra las secuencias de ácidos nucleicos de las CDRs de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del FR1-H7 (SEC ID NOS: 25-30). La Figura 1D muestra las secuencias de aminoácidos de las CDRs de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del FR1-H7 (SEC ID NOS: 1-6).
- La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de las regiones variables del FR1-A1. La Figura 2A muestra las secuencias de aminoácidos y de ADN de la región variable de la cadena pesada del FR1-A1 (SEC ID NOS: 15 y 39). La Figura 2B muestra las secuencias de aminoácidos y de ADN de la región variable de la cadena ligera del FR1-A1 (SEC ID NOS: 16 y 40). La Figura 2C muestra las secuencias de ácidos nucleicos de las CDRs de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del FR1-A1 (SEC ID NOS: 33-38). La Figura 2D muestra las secuencias de aminoácidos de las CDRs de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del FR1-A1 (SEC ID NOS: 9-14).
- La Figura 3 muestra la unión del anticuerpo FR1-H7 a FGFRs determinada usando el ensayo de unión ELISA. Cada punto de datos es un promedio de valores duplicados y las barras de error son desviaciones estándar.
- La Figura 4 muestra la unión del FGFR1-1 recombinante al ligando FGF determinada usando el ensayo de bloqueo ELISA. La Figura 4A muestra la unión al FGF-1 inmovilizado y la Figura 4B muestra la unión al FGF-2 inmovilizado. Cada punto de datos es un promedio de valores duplicados y las barras de error son desviaciones estándar.
- La Figura 5 muestra la unión del ^{125}I -FGF-2 al FGFR-1 de superficie de célula. En la Figura 5A, la unión del ^{125}I -FGF-2 a las células tiene dos componentes distintos: uniones no específicas y específicas. En la Figura 5B, la unión ^{125}I -FGF-2 a las células fue inhibida por la presencia del anticuerpo FR1-H7. Cada punto de datos es un promedio de valores triplicados. Las barras de error son desviaciones estándar.
- La Figura 6 muestra una transferencia Western de fosforilación del FGFR-1. La mancha superior se ensayó con anticuerpo anti-fosfo-tirosina y la mancha inferior muestra bandas de proteína de control en los lisatos de células para estimación de la carga relativa de gel.
- La Figura 7 muestra la proliferación de células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVECs) *in vitro* en presencia de anticuerpos. Cada punto de datos es un promedio de valores triplicados y las barras de error son desviaciones estándar.
- La Figura 8 muestra la proliferación de adipocitos *in vitro*. La Figura 8A muestra los efectos del FGF-2 sobre la proliferación de adipocitos y la Figura 8B muestra los efectos del FR1-H7 sobre la proliferación de adipocitos estimulada por FGF-2. Cada punto de datos es un promedio de valores triplicados. Las barras de error son desviaciones estándar.
- La Figura 9 muestra el efecto del FR1-H7 sobre el peso corporal en ratones hembras nu/nu (Media +/- SEM).
- La Figura 10 muestra el efecto del FR1-H7 sobre la ingesta de alimento en ratones hembras nu/nu.
- La Figura 11 muestra el efecto del FR1-H7 sobre el comportamiento en la crianza en un entorno nuevo (Media +/- SEM).
- La Figura 12 muestra el efecto del FR1-H7 sobre la glucosa en sangre. La Figura 12A muestra el efecto del FR1-H7 sobre la glucosa en sangre no en ayunas (Media +/- SEM). La Figura 12B muestra el efecto del FR1-H7 sobre la glucosa en sangre no en ayunas después de que los pesos se han recuperado totalmente (Media +/- SEM).
- La Figura 13 muestra la pérdida de peso corporal en ratones nu/nu después de una dosis única de tratamiento con FR1-H7 (Media +/- SEM, n=4).
- La Figura 14 muestra los efectos sobre los pesos de los tejidos después de una dosis única de tratamiento con FR1-H7. Cada barra representa el valor calculado como 100x la relación de peso del tejido sobre el peso corporal total. Las barras de error son desviaciones estándar.
- La Figura 15 muestra los efectos sobre la química del suero después de una dosis única de tratamiento con FR1-H7. En la Figura 15A, se determinaron los niveles de glucosa en suero (Media +/- SEM); en la Figura 15B, se determinaron los niveles de triglicéridos en suero; en la Figura 15C, se determinaron los niveles de insulina en suero; y en la Figura 15D, se determinaron los niveles de leptina en suero. Se muestran todas las mediciones individuales. Los datos tomados en los mismos puntos de tiempo se separaron de acuerdo con los grupos de tratamiento con fines de visualización.
- La Figura 16 muestra el efecto del FR1-H7 sobre el peso corporal en ratones negros C57 (Media +/- SEM).

La Figura 17 muestra el efecto del FR1-H7 sobre el peso corporal en ratones db/db (Media +/- SEM).

La Figura 18 muestra los efectos del FR1-H7 sobre las ingestas de alimentos en ratones db/db (Media +/- SEM).

La Figura 19 muestra los efectos del FR1-H7 sobre los tamaños del tejido adiposo (Media +/- SEM).

La Figura 20 muestra la unión del anticuerpo FR1-H7 a FGFRs determinada usando el ensayo de unión ELISA.

- 5 La Figura 21 muestra la unión del FGFR1 recombinante al ligando FGF determinada usando el ensayo de bloqueo ELISA.

La Figura 22 muestra una transferencia Western de fosforilación del FGFR-1.

La Figura 23 muestra la mitogénesis de células G18 *in vitro* en presencia de anticuerpos. Cada punto de datos es un promedio de valores triplicados. Las barras de error son desviaciones estándar.

- 10 La Figura 24 muestra el efecto del FR1-A1 sobre los pesos corporales en ratones hembras nu/nu (Media +/- SEM).

La Figura 25 muestra el efecto del FR1-A1 sobre las ingesta de alimentos en ratones hembras nu/nu.

- 15 La Figura 26 muestra el tratamiento de ratones negros C57 con FR1-H7, el cual causó disminuciones en los pesos corporales, ingesta de alimento, masa muscular y grasa, gasto de energía, actividades ambulatorias y Relación de Intercambio Respiratorio (RER) comparados con el control. La Figura 26A muestra disminución en el peso corporal diario con el tratamiento con FR1-H7 comparado con el control. La Figura 26B muestra disminución en la ingesta de alimento diario con el tratamiento con FR1-H7 comparado con el control. La Figura 26C muestra disminución en los pesos de músculo y grasa con el tratamiento con FR1-H7 comparado con el control. La Figura 26D muestra disminución en el gasto de energía y de actividades ambulatorias con el tratamiento con FR1-H7 comparado con el control. La Figura 26E muestra disminución en el consumo de oxígeno y la RER con el tratamiento con FR1-H7 comparado con el control.

- 20 La Figura 27 muestra una alimentación por parejas de animales tratados con FR1-H7 y de control que dieron como resultado una disminución idéntica en los pesos corporales, masa muscular y grasa, y gasto de energía entre los dos grupos. Igualmente, ambos grupos mostraron disminuciones similares en las actividades ambulatorias y la RER. La Figura 27A muestra disminución en el peso corporal diario tanto en los animales tratados con FR1-H7 como de control. La Figura 27B muestra una disminución en los pesos de músculo y grasa tanto en los animales tratados con FR1-H7 como de control. La Figura 27C muestra disminución en el gasto de energía y de actividades ambulatorias tanto en los animales tratados con FR1-H7 como de control. La Figura 27D muestra disminución en el consumo de oxígeno tanto en los animales tratados con FR1-H7 como de control.

- 25 La Figura 28 muestra las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de las regiones variables y las CDRs de región variable del FR1-4H. La Figura 28A muestra las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del FR1-4H y la región variable de la cadena ligera del FR1-4H (SEC ID NOS: 23-24 y 47-48). La Figura 28B muestra las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de los CDRs de la región variable de las cadenas pesada y ligera del FR1-4H (SEC ID NOS: 17-22 y 41-46).

- 30 La Figura 29 muestra que el FR1-4H inhibió la unión del FGFR-1(IIIb) al ligando FGF. El por ciento de unión se determinó usando el ensayo de bloqueo ELISA. Cada punto de datos es un promedio de valores duplicados. Las barras de error son desviaciones estándar.

La Figura 30 muestra ejemplos de inhibidores de molécula pequeña del FGFR que incluyen derivados de indolinona, derivados de quinoleinona y derivados de pirimido-piridina.

- 35 La Figura 31 muestra que los inhibidores de molécula pequeña de FGFR inhibieron la auto-fosforilación del FGFR-1(IIIc) en un ensayo de fosforilación a base de célula. Se aplicaron cantidades iguales de lisato de célula a cada banda de muestra. La auto-fosforilación del receptor se ensayó usando anticuerpo anti-fosfo-tirosina tal como se describe en el Ejemplo 20.

Descripción detallada de la invención

- 45 La presente invención proporciona un anticuerpo purificado, o un fragmento del mismo, el cual se une específicamente a un dominio extra-celular del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), y neutraliza la activación del receptor, en la que el anticuerpo comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) SEC ID NO:9 (VHCDR1), SEC ID NO:10 (VHCDR2), SEC ID NO:11 (VHCDR3), SEC ID NO:12 (VLCDR1), SEC ID NO:13 (VLCDR2) y SEC ID NO:14 (VLCDR3).

- 50 La presente divulgación proporciona anticuerpos purificados, o fragmentos de los mismos, específicos para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1(IIIb), FGFR-1(IIIc), o FGFR-4(IIIc). Un ejemplo de un anticuerpo que es específico para el FGFR-1(IIIb) y/o FGFR-1(IIIc), y/o FGFR-4(IIIc) es el FR1-H7 (Figura 1). Debería señalarse que la descripción en la presente invención con respecto al FR1-H7 es de aplicación para todos los anticuerpos

específicos para el FGFR-1(IIIb) y/o FGFR-1(IIIc). El FR1-A1 es un ejemplo de un anticuerpo específico para el FGFR-1(IIIc) y/o FGFR-4(IIIc) (Figura 2). De manera similar al FR1-H7, cualquier descripción con respecto al FR1-A1 es de aplicación para todos los anticuerpos específicos para el FGFR-1(IIIc) y/o FGFR-4(IIIc). El FR1-4H es un ejemplo de un anticuerpo de la invención específico para al menos el FGFR(IIIb) (Figura 28). Preferiblemente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención se unen a un dominio extracelular del FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), y neutralizan la activación del receptor. Más preferiblemente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención inhiben la unión a un ligando del FGFR-1(IIIc), y FGFR-4(IIIc) a su receptor.

Los anticuerpos que se producen de manera natural tienen, típicamente, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, estando cada cadena ligera covalentemente ligada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro inter-cadena y múltiples enlaces disulfuro que unen adicionalmente las dos cadenas pesadas entre sí. Las cadenas individuales pueden plegarse en dominios que tienen tamaños (110-125 aminoácidos) y estructuras similares, pero funciones diferentes. La cadena ligera puede comprender un dominio variable (V_L) y/o un dominio constante (C_L). Igualmente, la cadena pesada puede comprender un dominio variable (V_H) y/o, dependiendo de la clase o isotipo de anticuerpo, de tres o cuatro dominios constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 y C_H4). En humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, estando además IgA e IgG subdivididos en subclases o subtipos (IgA₁₋₂ e IgG₁₋₄).

Generalmente, los dominios variables muestran secuencias de aminoácidos de considerable variabilidad entre un anticuerpo y el siguiente, particularmente en el lugar del sitio de unión del antígeno. En cada una de V_L y V_H se han encontrado tres regiones, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o hipervariables, las cuales están soportadas por regiones menos variables denominadas regiones variables estructurales.

La porción de un anticuerpo constituido por dominios V_L y V_H se designa como Fv (fragmento variable) y constituye el sitio de unión del antígeno. La cadena sencilla Fv (scFv) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio V_L y un dominio V_H sobre una cadena polipéptida, en la que el terminal N de un dominio y el terminal C del otro dominio están unidos mediante un ligador flexible (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 4.946.778 (Ladner y otros); Patente WO 88/09344 (Huston y otros). La Patente WO 92/01047 (McCafferty y otros) describe el muestrario de fragmentos scFv sobre la superficie de envases de muestras genéticas recombinantes solubles, tal como bacteriófago.

Los ligadores péptidos usados para producir los anticuerpos de cadena sencilla, pueden ser péptidos flexibles seleccionados con el fin de asegurar que se produce el plegamiento tridimensional apropiado de los dominios V_L y V_H . Generalmente, el ligador tiene 10 a 50 restos aminoácidos. Preferiblemente, el ligador tiene 10 a 30 restos aminoácidos. Más preferiblemente, el ligador tiene 12 a 30 restos aminoácidos. Lo más preferiblemente, es un ligador que tiene 15 a 25 restos aminoácidos. Un ejemplo de dichos péptidos ligadores incluye repeticiones de cuatro Glicinas seguidas de Serina.

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de todos o algunos de los dominios constantes de los anticuerpos enteros a partir de los cuales se obtienen. En consecuencia, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de los anticuerpos enteros. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libre de ciertas interacciones no deseables entre las regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y pueden tener mayor permeabilidad que los anticuerpos enteros, permitiendo a los anticuerpos de cadena sencilla localizar y unirse a sitios de unión de antígeno diana más eficazmente. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos de cadena sencilla les hace ser menos probables de provocar una respuesta inmune no buscada en un receptor que los anticuerpos enteros.

Los anticuerpos de cadena sencilla múltiple, conteniendo cada cadena sencilla un dominio V_H y uno V_L ligados covalentemente mediante un primer ligador péptido, pueden estar ligados covalentemente por al menos uno o más ligadores péptidos para formar anticuerpos de cadena sencilla multivalente, la cual puede ser monoespecífica o multiespecífica. Cada cadena de un anticuerpo de cadena sencilla multivalente incluye un fragmento de cadena ligera variable y un fragmento de cadena pesada variable, y está ligada por un péptido ligador al menos a otra cadena. El péptido ligador está compuesto de al menos quince restos aminoácidos. El número máximo de restos aminoácidos es aproximadamente de un centenar.

Dos anticuerpos de cadena sencilla pueden combinarse para formar un diacuerpo, también conocido como un dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y puede ser monoespecífico o biespecífico. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio V_H conectado a un dominio V_L . Los dominios están conectados con ligadores que son lo suficientemente cortos como para prevenir el emparejamiento entre dominios de la misma cadena, impulsando, de esta forma, el emparejamiento entre dominios complementarios sobre diferentes cadenas para recrear los dos sitios de unión de antígeno.

Tres anticuerpos de cadena sencilla pueden combinarse para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos están contruidos con la terminación aminoácido de un dominio V_L o V_H directamente fusionado a la terminación carboxilo de un dominio V_L o V_H , es decir, sin ninguna secuencia de ligador. El triacuerpo tiene tres cabezas Fv con los polipéptidos dispuestos en una forma de cabeza con cola, cíclica. Una conformación

posible del triacuerpo es planar con los tres sitios de unión localizados en un plano con un ángulo de 120 grados entre sí. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Fab (fragmento de unión de anticuerpo) se refiere a los fragmentos del anticuerpo constituido por dominios $V_L C_L V_H C_{H1}$. A los generados de acuerdo con la digestión de la pepsina se denominan simplemente como Fab y no retienen la región bisagra de la cadena pesada. Después de la digestión de la pepsina, se generan varios Fabs que retienen la bisagra de la cadena pesada. A los fragmentos con los enlaces disulfuro intercadena intactos se denominan como $F(ab')_2$, mientras que cuando no se retienen los enlaces disulfuro, se produce un Fab' sencillo. Los fragmentos $F(ab')_2$ tienen mayor avidez por el antígeno que los fragmentos Fab monovalentes.

Fc (fragmento de cristalización) es la designación para la porción o fragmento de un anticuerpo que comprende dominios constantes de cadena pesada emparejados. En un anticuerpo IgG, por ejemplo, el Fc comprende dominios C_m y C_{H3} . El Fc de un anticuerpo IgA o un IgM comprende además un dominio C_{H4} . El Fc está asociado con la unión del receptor Fc, la activación de la citotoxicidad mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Para anticuerpos tales como IgA e IgM, los cuales son complejos de proteínas tipo IgG múltiples, la formación del complejo requiere dominios constantes Fc.

Finalmente, la región bisagra separa las porciones Fab y Fc, lo que proporciona la movilidad relativa de Fabs entre sí y con relación a Fc, así como la inclusión de múltiples enlaces disulfuro para el ligado covalente de las dos cadenas pesadas.

De acuerdo con ello, los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos que se producen de manera natural, fragmentos bivalentes tales como $(Fab')_2$, fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos de cadena sencilla, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio sencillo, anticuerpos de cadena sencilla multivalente, diacuerpos, triacuerpos, y similares, que se unen específicamente con antígenos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen también polipéptidos con secuencias aminoácidas substancialmente similares a la secuencia aminoácida de las regiones variable o hipervariable de los anticuerpos de la invención. Substancialmente, la misma secuencia aminoácida se define en la presente invención como una secuencia con al menos 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología con una secuencia aminoácida comparada, determinada mediante el procedimiento de investigación FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, págs. 2444-2448, (1988) y que se une al FGFR- y/o FGFR-2.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención son específicos para el FGFR-1(IIIc), y FGFR-4(IIIc). La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo por un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención, por ejemplo, pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen dos especificidades o sitios de unión de antígeno diferentes. Cuando un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítopos reconocidos pueden asociarse con un único antígeno o con más de un antígeno. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos, o fragmentos de los mismos, que se unen a dos antígenos diferentes, con al menos una especificidad para el FGFR-1(IIIc), y FGFR-4(IIIc).

La especificidad de los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, por el FGFR puede determinarse en base a la afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (K_d) mide la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión del anticuerpo. La avidez es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo con su antígeno. La avidez está relacionada tanto con la afinidad entre un epítipo con su sitio de unión de antígeno sobre el anticuerpo, como con la valencia del anticuerpo, la cual se refiere al número de sitios de unión de antígeno de un epítipo particular. Típicamente, los anticuerpos se unen con una constante de disociación (K_d) de 10^{-5} a 10^{-10} litros/mol (por ejemplo, $K_d < 100$ nM). Toda K_d menor de 10^{-4} litros/mol se considera, generalmente, indicativa de una unión no específica. Cuanto menor sea el valor de K_d , más fuerte es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo.

La presente invención proporciona un anticuerpo purificado, o un fragmento del mismo, específico para el FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), en el que el anticuerpo se une a un dominio extracelular de un FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc) y neutraliza la activación del receptor. En la presente memoria descriptiva, la neutralización de un receptor significa la inactivación de la actividad quinasa específica del receptor para transducir una señal. Un ensayo fiable para la neutralización del FGFR-1 o FGFR-4 es la inhibición de fosforilación del receptor. La presente invención no está limitada por ningún mecanismo particular de neutralización del FGFR. Algunos mecanismos posibles incluyen la prevención de la unión del ligando FGF al dominio de unión extracelular del receptor del FGF, induciendo la internalización de los receptores, y previniendo la dimerización u oligomerización de receptores.

La neutralización de la activación del FGF de un FGFR-1 o FGFR-4, puede determinarse por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, la neutralización de la activación del FGF de un FGFR en una muestra de células endoteliales o no endoteliales, tal como en tejido adiposo o células tumorales, puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Dicha neutralización en una muestra de células que expresan el FGFR-1 o FGFR-4, implica el poner en contacto las células con un anticuerpo de la invención. *In vitro*, las células se ponen en contacto con el anticuerpo antes, simultáneamente, o después, de la adición del FGF a la muestra de células.

Además, la invención proporciona el anticuerpo de la invención que inhibe la unión de un ligando del FGFR-1(IIIc) y/o FGFR-4 a su receptor. El anticuerpo puede ser una forma de corte y empalme alternativa que contiene la función de unión del ligando. Algunos ejemplos de los ligandos del FGFR-1(IIIc) incluyen FGF-1, -2, -4, -5, y -6. Algunos ejemplos de los ligandos del FGFR-4(IIIa) incluyen FGF-1, -2, -4, -6, -8b, -8e, -8f, -9, -16, -17b, y -19. (Véase, Endocrine-Related Cancer, vol. 7, págs. 165-197 a 165-169, (2000), "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling", C.J. Powers, S.W. Mcleskey y A. Willstein).

Una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los presentes anticuerpos tienen secuencias seleccionadas a partir del grupo constituido por la SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5 y SEC ID NO:6 (es decir, cualquiera de las CDRs del FR1-H7). En una realización preferida, una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los presentes anticuerpos tienen secuencias seleccionadas a partir del grupo constituido por la SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, SEC ID NO:13 y SEC ID NO:14 (es decir, cualquiera de las CDRs del FR1-A1). Una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los presentes anticuerpos tienen secuencias seleccionadas a partir del grupo constituido por la SEC ID NO:17, SEC ID NO:18, SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, SEC ID NO:21 y SEC ID NO:22 (es decir, cualquiera de las CDRs del FR1-4H).

Los anticuerpos de la presente divulgación tienen una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEC ID NO:7 (es decir, la región variable de cadena pesada del FR1-H7) y/o una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO:8 (es decir, la región variable de cadena ligera del FR1-H7). Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención tienen, preferiblemente, una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEC ID NO:15 (es decir, la región variable de cadena pesada del FR1-A1) o una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO:16 (es decir, la región variable de cadena ligera del FR1-A1). Como alternativa, los anticuerpos de la presente divulgación tienen una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEC ID NO:23 (es decir, la región variable de cadena pesada del FR1-4H) o una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO:24 (es decir, la región variable de cadena ligera del FR1-4H).

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de las CDRs y las cadenas pesadas y ligeras variables de los anticuerpos se describen en secuencias listadas en la SEC ID NO:1 a 48. Igualmente, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención, equivalentes de anticuerpos o fragmentos de los mismos (SEC ID NO:33-40). Los ácidos nucleicos codificados para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de la invención o sus equivalentes, se han obtenido mediante técnicas de biología molecular convencionales. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen las que se unen bajo condiciones restrictivas a las SEC ID NOS:33-40 y las que codifican subunidades de anticuerpos polipéptidos funcionalmente equivalentes capaces de unirse al FGFR-(IIIc) y FGFR-4(IIIc). Por condiciones restrictivas quiere indicarse condiciones para la hibridación, tales como, hibridación a ADN unido en filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel F.M. y otros, eds., Current Protocols in Molecular Biology, vol.I, págs. 2.20.3, (1989), Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. New York) o condiciones moderadamente restrictivas; lavado en 0,2SSC/SDS al 0,1% a 42°C (Ausubel y otros, véase anteriormente, (1989)).

Los anticuerpos monoclonales de la invención, por ejemplo, FR1-A1, pueden producirse por procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen procedimientos inmunológicos descritos por Kohleer y Milstein en Nature, vol. 256, págs. 495-497, (1975) y Campbell en "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas", en Burdon y otros, Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 13, (1985), Elsevier Science Publishers, Amsterdam; así como mediante el procedimiento de ADN recombinante descrito por Huse y otros, en Science, vol. 246, págs. 1275-1281, (1989).

Los anticuerpos de la invención pueden prepararse mediante inmunización de un mamífero con un FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc) soluble. Los receptores solubles pueden usarse por sí mismos como inmunógenos, o unirse a una proteína portadora u otros objetos, tales como esférulas, es decir, esférulas de Sepharosa. Una vez que el mamífero ha producido anticuerpos, se aíslan una mezcla de células productoras de anticuerpos, tales como esplenocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante aislamiento de células productoras de anticuerpos individuales a partir de la mezcla e inmortalización de las mismas, por ejemplo, mediante fusión de las mismas con células tumorales, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes se conservan en cultivo, y expresan anticuerpos monoclonales, los cuales se recolectan a partir del medio de cultivo.

Los anticuerpos pueden prepararse igualmente a partir de FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc) unido a la superficie de células que expresan el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc). La célula a la cual estos receptores puede estar unido puede ser una célula conocida para expresar preferencialmente receptores individuales, por ejemplo el FGFR-1(IIIc) humano está expresado sobre células tales como células macrófagas, células progenitoras hematopoyéticas, y numerosas células tumorales, el FGFR-4(IIIc) humano está expresado sobre células tales como células madre multipotenciales y embrionarias (véase, R&D Systems, Cytokine Mini Review, (2001), "FGFR expression"). Como alternativa, la célula a la cual está unido el receptor puede ser una célula dentro de la cual ha sido transferido el ADN que codifica el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc).

El FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc) puede usarse como un inmunógeno para generar un anticuerpo de la invención. El péptido receptor puede obtenerse a partir de fuentes naturales, tal como a partir de células que expresan los anteriores receptores. Igualmente, puede obtenerse un péptido receptor sintético usando máquinas comercialmente disponibles y la secuencia aminoácida correspondiente (véase, Endocrine Related Cancer, págs. 7165-197 a 174, (2000)). Otra alternativa aún, es que un ácido nucleico que codifica un FGFR-1(IIIc), FGFR-1(IIIc), o FGFR-4(IIIc) tal como un ADNc o un fragmento del mismo, puede ser clonado y expresado y el polipéptido resultante recuperarse y usarse como un inmunógeno para generar un anticuerpo de la invención. Con el fin de preparar los receptores anteriores contra los cuales están hechos los anticuerpos, las moléculas de ácido nucleico que codifican el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc), o porciones de los mismos, especialmente las porciones extracelulares de los mismos, pueden insertarse dentro de vectores conocidos para la expresión en células huéspedes, usando técnicas de ADN recombinantes convencionales. Las fuentes adecuadas de dichas moléculas de ácidos nucleicos incluyen células que expresan el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc).

La presente invención proporciona igualmente un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o un fragmento del mismo, de la presente invención ligado de manera operable a una secuencia de control, así como una célula huésped que contiene dicho vector de expresión. Estas células huéspedes pueden cultivarse bajo condiciones específicas que permiten la expresión de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención y, a continuación, los anticuerpos pueden purificarse a partir de las células huéspedes.

Una vez más, para expresar los anticuerpos de la invención, se usan técnicas recombinantes convencionales y vectores de expresión conocidos. Son conocidos los vectores para la expresión de proteínas en bacterias, especialmente *E. coli*. Dichos vectores incluyen los vectores PATH descritos por Dieckmann y Tzagoloff en J. Biol. Chem., vol. 260, págs. 1513-1520, (1985). Estos vectores contiene secuencias de ADN que codifican antranilato sintetasa (TrpE) seguido de un poliligador en la terminación carboxi. Otros sistemas de vectores de expresión están basados en beta-galactosidasa (pEX); P_L lambda; proteína de unión de maltosa (pMAL); y glutatión S-transferasa (pGST) (véanse, Gene, vol. 67, pág. 31, (1988) y Peptide Research, vol. 3, pág. 167, (1990)).

En levaduras se encuentran disponibles vectores útiles. Un ejemplo adecuado es el plásmido 2μ. Igualmente, se conocen vectores adecuados para expresión en células de mamíferos. Dichos vectores incluyen derivados bien conocidos de SV-40, adenovirus, secuencias de ADN obtenidas de retrovirus y vectores lanzadera obtenidos de la combinación de vectores funcionales de mamíferos, tales como los descritos anteriormente, y plásmidos funcionales y ADN de fago.

En la técnica se conocen otros vectores de expresión eucarióticos (por ejemplo, P.J. Southern y P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., vol. 1, págs. 327-341, (1982); S. Subramani y otros, Mol. Cell. Biol., vol. 1, págs. 854-864, (1981); R.J. Kaufmann y P.A. Sharp, "Amplification And Expression Of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene", J. Mol. Biol., vol. 159, págs. 601-621, (1982); R.J. Kaufmann y P.A. Sharp, "Amplification And Expression Of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene", J. Mol. Biol., vol. 159, págs 601-664, (1982); S.I. Scahill y otros, "Expression And Characterization Of the Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 80, págs. 4654-4659, (1983); G. Urlaub y L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 77, págs. 4216-4220, (1980)).

Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de control de expresión que está operativamente ligada a la secuencia de ADN o fragmento a expresar. La secuencia de control está insertada en el vector con el fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de secuencias de control de expresión útiles son el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, las regiones promotoras y operadoras principales del fago lambda, la región de control de la proteína de cubierta fd, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores fosfatasa ácida de levadura, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura, y promotores obtenidos de polioma, adenovirus, retrovirus, y virus símico, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas y sus virus o combinaciones de los mismos.

Los vectores que contienen las señales de control y el ADN a expresar, tal como los que codifican los anticuerpos de la invención, anticuerpos equivalentes de los mismos, o el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc), están insertados dentro de una célula huésped para expresión. Algunas células huéspedes de expresión útiles incluyen células procarióticas y eucarióticas bien conocidas. Algunas células procarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI, y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacilos*, tales como *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*. Las células eucarióticas adecuadas incluyen células de levadura y otros hongos, insectos, animales, tales como células COS y células CHO, células humanas y células de plantas en cultivo de tejidos.

Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende el cultivo de la célula huésped que comprende el vector, comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la invención bajo condiciones que permiten la expresión del anticuerpo. Después de la expresión en una célula huésped mantenida en un medio adecuado, el polipéptido o péptido a expresar, tal como el que codifica los anticuerpos de la invención, equivalentes de

anticuerpos de los mismos, o el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc), pueden aislarse a partir del medio, y purificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Si el polipéptido o péptido no es secretado dentro del medio de cultivo, las células huéspedes son lisadas antes del aislamiento y purificación.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de esta invención o fragmentos del mismo y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

El vehículo, tal como se usa en la presente invención, incluye vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables farmacéuticamente que son no tóxicos para la célula o mamífero a ser expuesto al mismo, a las dosificaciones y concentraciones usadas. Frecuentemente, el vehículo aceptable farmacéuticamente es una solución de pH tamponeado acuosa. Los ejemplos de vehículos aceptables farmacológicamente incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, mannososa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tal como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tal como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietileno glicol (PEG), y PLURONICS®.

Los ingredientes activos pueden estar igualmente ocluidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmecrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están la forma de matrices conformadas, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroximetil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (Patente de EE.UU. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leoprolido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, estos pueden desnaturarse o agregarse como un resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización, dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es por la formación del enlace S-S intermolecular mediante el intercambio tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización mediante la modificación de los restos sulfhidrilo, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido en humedad, el uso de aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones matrices polímeras específicas.

Un procedimiento de identificación del FR1-A1 o fragmentos del mismo, puede implicar el proporcionar una biblioteca de fragmentos de anticuerpos, el rastreo de la biblioteca para determinar un anticuerpo que sea específico para el FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), y la purificación del anticuerpo que es específico para el FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc). De acuerdo con ello, la presente divulgación proporciona también un procedimiento de identificación de un anticuerpo específico del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), o un fragmento del mismo, tal como sigue: (i) proporcionar una biblioteca de fragmentos de anticuerpos, (ii) rastreo de la biblioteca para determinar el anticuerpo que es específico para el FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), y (iii) purificación del anticuerpo que es específico para el FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc). El rastreo de la biblioteca puede implicar (i) el suministrar una matriz de afinidad que tenga el FGFR-1(IIIc) y/o FGFR-4(IIIc) unido a un soporte sólido, (ii) la puesta en contacto de la matriz de afinidad con la biblioteca de los fragmentos de anticuerpos, y (iii) la separación de los fragmentos de anticuerpos que se unen a la matriz de afinidad de los fragmentos de anticuerpos que no se unen a la matriz de afinidad. Estos procedimientos pueden usarse para identificar un anticuerpo.

Igualmente, pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de muestrarios de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, vol. 227, pág. 381, (1991); Markas y otros, *J. Biol. Mol.*, vol. 222, pág. 581, (1991)]. Igualmente, se encuentran disponibles las técnicas de Cole y otros y de Boemer y otros, para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos [(Cole y otros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77, (1985) y Boemer y otros, *J. Immunol.*, vol. 147, (no. 1), págs. 86-95, (1991)]. De manera similar, pueden obtenerse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana dentro de animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cuales se han inactivado parcial o completamente los genes de inmunoglobulina endógenos. Tras la exposición, se observó producción de anticuerpo humano, lo cual se asemeja íntimamente a lo observado en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación de genes, ensamblado, y repertorio de anticuerpos. Esta vía se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks y otros, *Bio/Technology*, vol. 10, págs. 779-783, (1992); Lonberg y otros, *Nature*, vol. 368, págs.

856-859, (1994); Morrison, *Nature*, vol. 368, págs. 812-13, (1994); Fishwild y otros, *Nature Biotechnology*, vol. 14, págs. 845-51, (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, vol. 14, pág. 826, (1996); Londberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, vol. 13, págs. 65-93, (1995).

5 Un anticuerpo purificado es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural que podrían interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y que pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos y no proteináceos, generalmente han sido eliminados.

10 Los anticuerpos monoclonales de la invención secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o de fluido ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis de gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

15 La presente divulgación proporciona además el procedimiento de identificación y aislamiento del FR1-A1, en el que el rastreo de la biblioteca comprende el proporcionar una matriz de afinidad que tiene el FGFR-1(IIIc), FGFR-4(IIIc), y/o formas de corte y empalme alternativas que contienen la función de unión de ligando unida a un soporte sólido, la puesta en contacto de la matriz de afinidad con la biblioteca de fragmentos de anticuerpos, y la separación de los fragmentos de anticuerpos que se unen a la matriz de afinidad de los fragmentos de anticuerpos que no se unen a la matriz.

20 Por soporte sólido se entiende una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc). Los ejemplos de fases sólidas abarcadas por la presente invención incluyen los formados parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término incluye igualmente una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. No. 4.275.149.

25 Igualmente, mediante la presente invención se suministran las composiciones útiles en los procedimientos de tratamiento que implican la administración a un mamífero que lo necesite de una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo de la invención. Los estados para los cuales estas composiciones son útiles incluyen obesidad o un estado relacionado con la obesidad, y diabetes o un estado relacionado con la diabetes. Los estados específicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, hipertensión, enfermedad cardiovascular, y angiogénesis. Igualmente, las composiciones son útiles para la reducción de la ingesta de alimento, índice de masa corporal, o alteración del metabolismo energético. Más aún, estas composiciones pueden ser útiles en la modulación de triglicéridos en suero y los niveles de leptina.

35 Un estado relacionado con la obesidad se refiere a un estado, el cual es el resultado de, o que está agravado por, la obesidad., tal como, pero sin limitarse a ellos, trastornos dermatológicos tales como infecciones, venas varicosas, *Acanthosis nigricans*, y eczema, intolerancia al ejercicio, diabetes (Tipo 2), resistencia a la insulina, hipertensión, hipercolesterolemia, colestasis, lesión ortopédica, enfermedad tromboembólica, cáncer, y enfermedad del corazón coronaria (o cardiovascular), particularmente los estados cardiovasculares asociados con alto contenido en triglicéridos y ácidos grasos libres en un individuo, artritis, somnolencia diurna, apnea del sueño, enfermedad renal en fase terminal, enfermedad de la vesícula biliar, gota, trastornos cardíacos, respuesta inmune descompensada, función respiratoria descompensada, infecciones como consecuencia de heridas, infertilidad, enfermedad hepática, dolor de la zona inferior de la espalda y complicaciones obstétricas y ginecológicas, dolor, pancreatitis, apoplejía, complicaciones quirúrgicas, incontinencia urinaria por estrés, trastornos gastrointestinales.

40 Por tratamiento se entiende cualquier tratamiento de una enfermedad en un animal e incluyen: (1) prevención de que la enfermedad se produzca en un mamífero que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que no la ha experimentado o muestra aún síntomas de la enfermedad; por ejemplo, prevención del brote de los síntomas clínicos; (2) inhibición de la enfermedad, por ejemplo, detención de su desarrollo; o (3) alivio de la enfermedad, por ejemplo, dando lugar a la regresión de los síntomas de la enfermedad.

45 Por cantidad eficaz para el tratamiento de una enfermedad se entiende aquella cantidad que, cuando se administra a un mamífero que lo necesita, es suficiente para producir el tratamiento, tal como se ha definido anteriormente, para dicha enfermedad.

50 Igualmente, la presente invención proporciona composiciones útiles en un procedimiento de tratamiento de la diabetes (tipo 2) o un estado relacionado con la diabetes (tipo 2), que comprende la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo de la invención.

55 Por un estado relacionado con la diabetes, se entiende un estado, el cual es el resultado de, o el cual ha sido agravado por la diabetes, tal como, pero sin limitarse a ellos, enfermedad del corazón y vasos sanguíneos, ataque al corazón, apoplejía, pobre circulación sanguínea en piernas y pies, presión sanguínea alta, hipertensión, ceguera o problemas de visión, fallo o infección renal, infección de la vejiga urinaria, lesión nerviosa, heridas de lenta curación, infecciones del pie, o infecciones de encías.

La identificación de mamíferos que necesitan de tratamiento entra dentro de la capacidad y conocimientos de un experto en la técnica. Por ejemplo, los individuos humanos que o bien sufren de obesidad y diabetes clínicamente significativas tales como hipertensión, enfermedad cardiovascular, niveles de glucosa en sangre, masa corporal, niveles de triglicéridos en suero, angiogénesis, y/o metabolismo energético (u otra enfermedad relacionada) o que están en riesgo de desarrollar clínicamente dicha enfermedad significativa, son adecuados para la administración del presente antagonista. Un clínico experto en la técnica puede fácilmente determinar, por ejemplo, mediante el uso de ensayos clínicos, examen físico e historial médico/familiar, si un individuo es un paciente que tiene dicha enfermedad.

Además, la presente invención proporciona composiciones útiles en un procedimiento de tratamiento para afectar a estados relacionados con la obesidad y diabetes tales como hipertensión, enfermedad cardiovascular, niveles de glucosa en sangre, masa corporal, niveles de triglicéridos en suero, angiogénesis, y/o metabolismo energético.

La angiogénesis es el proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que implica la proliferación, migración e infiltración de tejidos de células endoteliales capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes.

El procedimiento de tratamiento descrito en la presente invención puede usarse para tratar cualquier mamífero adecuado, preferiblemente el mamífero es un humano.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración únicamente, no estando destinados a limitar el ámbito de la invención de ninguna manera. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los usados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos dentro de dichos vectores y plásmidos, o la introducción de plásmidos dentro de células huéspedes. Dichos procedimientos son bien conocidos para los expertos normales en la técnica y están descritos en numerosas publicaciones, incluyendo Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Edition, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ejemplo 1 - Ensayos

Ensayo de rastreo ELISA

Se recubrieron FGFs recombinantes (R&D Systems, Minneapolis, MN) sobre placas de microvaloración Immulon® 2B (ThermoLab Systems, Franklin, MA) a concentraciones de 0,5-2 µg/ml durante 2 horas. A continuación, las placas se lavaron con Tween 20 al 0,2%/PBS, y se bloquearon con leche al 5%/PBS durante 2 horas antes de su uso. El fago o anticuerpo se diluyó en serie con 5 µg/ml de heparina (Sigma, St Louis, MO), leche al 5%, PBS. A continuación, se agregó el FGFR-1 recombinante (R&D Systems) hasta una concentración final de 1 µg/ml. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora antes de transferirla a las placas recubiertas con el FGF-2, y se incubó a temperatura ambiente durante un tiempo adicional de 2 horas. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,2%/PBS. Los receptores unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal Fc anti-humano acoplado con solución HRP (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) preparada de acuerdo con las instrucciones del suministrador. Los datos se presentaron como % de inhibición de unión del ligando al receptor de los controles.

Ensayo de unión

Los FGFRs recombinantes (R&D Systems) a una concentración de 1 µg/ml en PBS se recubrieron sobre placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,2%/PBS, y se bloquearon con leche al 5%/PBS durante 2 horas antes de su uso. Se agregó el FR1-H7 o FR1-A1 a la placa y se diluyó en serie con Tween 20 al 0,2%/PBS. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas más. Los anticuerpos capturados se detectaron usando anticuerpo monoclonal de cadena ligera anti-humano conjugado con solución HRP (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) preparada de acuerdo con las instrucciones del suministrador. Las cinéticas de unión del anticuerpo al FGFR-1 se determinaron usando un biosensor BiaCore® 3000 (BiaCore, Inc., Piscataway, NJ) siguiendo los protocolos convencionales sugeridos por el fabricante. La cinética de unión (Kd) del FR1-H7 determinada usando el biosensor BiaCore fueron las siguientes:

FGFR-1b:	60 pM
FGFR-1c:	40 pM
FGFR-2b:	> 1 µM
FGFR-2c:	> 1 µM
FGFR-3b:	> 1 µM
FGFR-3c:	> 1 µM
FGFR-4:	0,2 µM

Ensayo de bloqueo a base de células

Se construyó una línea de células que expresan el FGFR-1(IIIc) mediante L6 de transfección retro-vírica (ATCC, Manassas, VA) usando un vector pBABE que tiene un gen resistente a la puomicina (Invitrogen). Las células transfectadas se cultivaron en FBS al 10%, DMEM (Invitrogen) en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos hasta que se alcanzó la confluencia. Antes del experimento de bloqueo, las células se dejaron sin suministrar suero durante 8-24 horas a 37°C en medio DMEM que contenía FBS al 0,1% y 5 µg/ml de heparina. Antes de la adición de cualquier reactivo, las placas se colocaron sobre hielo durante 1 hora para minimizar la internalización del receptor. Para el experimento de unión, se agregó el FGF-2 recombinante yodado a diversas concentraciones a los pocillos de las placas. Para los experimentos de bloqueo, se agregó anticuerpo FR1-H7 diluido en serie y se incubó con las células sobre hielo durante 1 hora antes de agregar el FGF-2 recombinante yodado a cada pocillo a una concentración final de 15 ng/ml. La unión fue durante 1 hora a 0-4°C, al cabo de cuyo tiempo las soluciones se aspiraron y las placas se lavaron 5 veces con PBS enfriado en hielo. Las células se lisaron con 0,5 ml de tampón de lisis de células enfriado en hielo durante 30 minutos. La radioactividad de los lisatos de células se detectó usando un contador gamma automático Wizard™ 1470 (Turku, Finlandia). La interacción no específica se determinó en un experimento de unión en el cual se incubó el FGF-2 yodado con las células en presencia de 200 veces en exceso de ligando frío.

Ensayo de fosforilación

Se cultivaron células L6 que expresan el FGFR-1 en FBS al 10%, DMEM, en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos hasta confluencia. Las células se dejaron sin suministrar suero en 5 µg/ml de heparina, FBS al 0,1%, DMEM, durante 8-24 horas. A los medios se agregó o bien el FR1-H7 o bien FR1-A1 y se dejaron unir a los receptores de superficie de células a 37°C durante 1 hora. A continuación, las células se estimularon con 20 ng/ml de FGFs a 37°C durante 10 minutos antes de lisarlas usando tampón de lisis enfriado en hielo durante 30 minutos. El lisato de células se sometió a SDS-PAGE seguido de transferencia Western. Las membranas se ensayaron con anticuerpo anti-fosfotirosina (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA) para la detección de receptores del FGFR-1 fosforilado de acuerdo con las instrucciones del suministrador.

Ensayo de proliferación

Se sembraron células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVECs) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/ml. Después de la unión, las células se mantuvieron quiescentes en medio EMG-2 que carecía de EGF, VEGF y FGF-2 (Cambrex, East Rutherford, NJ) durante 24 horas. Los medios quiescentes en los pocillos se aspiraron y reemplazaron con EMG-2 que contenía todos los factores de crecimiento anteriormente mencionados. Los anticuerpos se diluyeron en serie y se agregaron a los pocillos. Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% en un Muairé™ DH y se agregaron a los pocillos. Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% en un incubador de autoflujo Muairé™ DH (Cryostar Industries, Inc., White Hall, PA) durante 48-72 horas. El desarrollo de las células se determinó controlando la incorporación de ³H-timidina usando un contador de centelleo líquido Microbeta 1450 (Perkin Elmer, Gaithersburg, MD).

Se obtuvieron adipocitos humanos grado 2 de dos semanas de edad (después diferenciación inducida) procedentes de Zen-Bio Inc. (Research Triangle, NC), y se mantuvieron en los medios de expedición en una placa de cultivo de 96 pocillos. Con el fin de evaluar los efectos del FGF-2 sobre la proliferación de adipocitos, se diluyó en serie el FGF-2 recombinante (R&D Systems) y se agregó a los pocillos de la placa. Las células se dejaron desarrollar en el incubador durante 60 horas, antes de determinar la proporción de incorporación de ³H-timidina. Con el fin de evaluar los efectos del FR1-H7 sobre la proliferación de adipocitos, el anticuerpo se diluyó en serie y se agregó a las células antes de la adición del FGF-2 recombinante hasta una concentración final de 15 ng/ml. La incorporación de ³H-timidina se determinó después de 60 horas de incubación.

Ensayo de mitogénesis

Se sembraron células G18 de astrocitoma humano en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/ml. Después de la unión, las células se dejaron quiescentes durante 24 horas en medios RPMI (Invitrogen) que contenían FBS al 0,1% y 5 µg/ml de heparina. Los anticuerpos se diluyeron en serie, se agregaron a los pocillos, y se incubaron con las células a 37°C durante 1 hora. A continuación, se agregó el FGF-2 recombinante hasta una concentración final de 5 ng/ml. Las células se incubaron en un incubador a 37°C con CO₂ al 5%. El desarrollo de las células se determinó 24 horas después mediante el control de la incorporación de ³H-timidina tal como se ha descrito anteriormente.

Estudios en animales - Consumo de alimento, comportamiento, y glucosa en suero

Se alojaron 4-5 ratones desnudos atímicos hembra (Cr1:NU/NU-nuBR, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) por jaula. Los ratones se les administró alimento tratado en autoclave (Lab Diet #5001, PMI Feeds Inc., St. Louis, MO) y agua *ad libitum*. Todo el uso de animales en este estudio se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos institucionales aprobados de uso y cuidado de animales, y de acuerdo con las directrices del NIH (Guide for the Care and Use of laboratory Animals, NIH Publication, no. 86-23, (1985)).

En un ensayo, se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) ratones con el FR1-H7 a 0,19, 1,9, y 19 mg/kg de peso corporal (n=5 por grupo). En otro ensayo, se inyectaron subcutáneamente (s.c.) ratones con el anticuerpo a 0,4, 4, y 40 mg/kg de peso corporal. En colas de control, los ratones se trataron con solución salina i.p. o s.c. Además, un grupo de ratones se dejó sin tratar (n=4). Todos los tratamientos se administraron a un volumen de 10 µl/g de peso corporal en solución salina. Los tratamientos comenzaron un Miércoles (Día 0) con tratamientos adicionales los siguientes

Viernes, Lunes, Miércoles, y Viernes. Después de este período de tratamiento de 9 días, los ratones no recibieron tratamientos adicionales.

Como alternativa, se inyectaron (i.p.) ratones desnudos atímicos hembra con solución salina, 2 mg/kg, ó 20 mg/kg de FR1-A1 un Lunes (Día 0) y Miércoles. Los pesos corporales se midieron antes de la primera inyección, y el Día 2 y Día 5. La ingesta de alimento por grupo se midió 2 días después de la primera inyección.

Los pesos corporales de todos los animales se midieron 3 veces/semana. El consumo de alimento, comportamiento y glucosa en suero se valoraron tal como sigue. Medición de la Ingesta de Alimento: Antes del tratamiento el Día 2 los ratones se alojaron en una nueva jaula y se pesó el peso del contenedor de alimento lleno en la jaula. Antes del tratamiento el Día 5 se midió nuevamente el peso del contenedor de alimento. La diferencia entre el Día 2 y el Día 5 en el peso del contenedor de alimento se dividió por el número de ratones por jaula y el número de días entre las mediciones para obtener una ingesta de alimento por ratón por 24 horas. Medición de Actividad: El Día 12, 3 días después del final del tratamiento, los ratones se alojaron individualmente en una nueva jaula y se contó el número de crías a lo largo de un período de 1 minuto. Medición de glucosa en sangre: El Día 16, 7 días después del tratamiento final, se midió la glucosa en sangre de los que no estuvieron en ayunas en sangre recogida de la punta de la cola usando glucosímetro en sangre Ascensia Elite XL (procedimiento de glucosa oxidasa, Bayer, Pittsburg, PA).

Estudios en animales - Gasto energético y composición del cuerpo

El concepto de homeostasia energética sugiere que la pérdida de peso es el resultado de la disminución del consumo de alimentos, incremento del gasto energético, o una combinación de ambos. Para averiguar el mecanismo de la pérdida de peso inducida por los anticuerpos antagonísticos del FGFR, se estudió el efecto del FR1-H7 sobre el gasto energético y composición del cuerpo de los ratones. Los ratones tratados con el FR1-H7 mostraron disminuciones en el peso corporal, ingesta de alimento, músculo y masa grasa, consumo energético y Relación de Intercambio respiratorio (RER), comparado con los controles (Figura 26). Igualmente, se realizó un experimento de alimentación por parejas, en las cuales el consumo de alimento de los animales tratados con el anticuerpo de control se restringió hasta exactamente el de los animales tratados con el FR1-H7 (Figura 27). Los animales procedentes de los dos grupos de tratamiento mostraron idénticas trayectorias de pérdida de peso en un período de 5 días. Más aún, la composición del cuerpo (Día 1 y 5) y el consumo energético determinado para los dos grupos fueron en su mayor parte indistinguibles. Estos resultados sugieren que la pérdida de peso inducida por el tratamiento con el FR1-H7 puede atribuirse en su mayor parte a la reducción de la ingesta de alimento. Esto lo corrobora el que, una disminución más importante en los valores de RER en estos animales en los últimos días del experimento, sugiere una mayor dependencia en la fuente de energía interna (es decir, metabolismo de lípidos), con el fin de compensar el déficit en la ingesta de alimento.

Este estudio estaba constituido por dos fases. En la primera fase, se separaron aleatoriamente ratones negros C57 hembras (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) en dos grupos (n=16) y se alojaron individualmente en una jaula metabólica. Ambos grupos de ratones se les administró alimento con alto contenido en carbohidratos y agua *ad libitum*. Los dos grupos de ratones se trataron con el FR1-H7 e IgG humano de control (10 mg/kg de peso corporal, intraperitonealmente), respectivamente, el Día 2 y el Día 4. La composición del cuerpo se determinó usando RMN el Día 1 y el Día 5. El peso corporal y el consumo de alimento se determinaron diariamente. El gasto energético, actividades ambulatorias, y consumo de oxígeno se controlaron continuamente. Los RER se calcularon en base al gasto energético y consumo de oxígeno.

En la segunda fase, a ambos grupos de ratones se les suministró agua *ad libitum*, pero únicamente 2 g de alimento de alto contenido en carbohidrato a cada animal por día. La cantidad de alimento administrado se determinó en la primera fase del experimento como el consumo de alimento diario promedio de dichos animales un día después de haber sido tratados con el FR1-H7 (10 mg/kg de peso corporal, intraperitonealmente). Los dos grupos de ratones se trataron y controlaron de la misma manera que la descrita en la primera fase del experimento.

Ejemplo 2 - Aislamiento de anticuerpos monoclonales (FR1-H7)

Se dispuso de una biblioteca de Fab humano expuesta en un fago procedente de la Dyax Corp. (Cambridge, MA) para clones de anticuerpo monoclonal (Fab) anti-FGFR-1(IIIb). Se recubrieron tubos Polystirene Maxi-soap (75x12 mm, Nalge Nunc International, Rochester, NY) con 50 µg de FGFR-1(IIIb) (R&D Systems, Minneapolis, MN) durante una noche, y se bloquearon con leche al 3%/PBS a 37°C durante 2 horas. Se agregó una mezcla de 0,8 ml de biblioteca de fago ($>10^{13}$ cfu/ml), 200 µl de 2 mg/ml de IMC-IC11 (ImClone Systems Incorporated, New York, NY), y 200 µl de leche al 18%/PBS, y se incubó en el tubo a temperatura ambiente durante 2 horas. El anticuerpo IMC-1C11 sirvió para bloquear la retención de clones de Fab que son reactivos únicamente al Fc-tag del receptor recombinante. El tubo se lavó 15 veces con Tween 20 al 0,1%/PBS (PBST), seguido de 15 veces con PBS. El fago de Fab unido se eluyó mediante incubación del tubo con 1 ml de trietilamina 100 mM recién preparada (SIGMA, St. Louis, MO) a

temperatura ambiente durante 10 minutos. El eluyente se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml que contenía 0,5 ml de tampón Tris-HCl 1 M, pH 7,5. El fago se rescató mediante la adición de 12,5 ml y 1 ml células TG1 de *E. coli* recientes (DO_{600nm} : 0,5-0,8) al eluyente y agitación en cubeta del tubo, respectivamente. Las células de *E. coli* se incubaron a 37°C sin agitación durante 30 minutos y, a continuación, con agitación a 100 rpm durante un tiempo adicional de 30 minutos. Las células TG1 infectadas se combinaron y desarrollaron en 2xYT (Bio 101® Systems, Carlsbad, CA)/Amp/glucosa (2xYTAG) a 30°C durante una noche y, a continuación, se recolectaron y almacenaron a -80°C para uso futuro.

El fago se desarrolló mediante cultivo de 25 ml de células infectadas en presencia de 1 ml de fago ayudante M13KO7 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El cultivo de la célula se incubó a 37°C sin agitación durante 30 minutos, y con agitación (225 rpm) durante un tiempo adicional de 30 minutos. El cultivo de la célula se transfirió dentro de un tubo Falcon® de 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), y se centrifugó a 1.500xg durante 10 minutos. A continuación, el gránulo de células se volvió a suspender en 25 ml de medio 2xYT/Amp/Kan (2xYTAK), se transfirió a un matraz de 250 ml nuevo, y se desarrolló a 30°C durante una noche con agitación (225 rpm). A continuación, el cultivo se transfirió dentro de un tubo de centrífuga y se centrifugó a 7.000xg durante 10 minutos. El sobrenadante se separó cuidadosamente a un tubo de centrífuga nuevo, y se mezcló con solución PEG/NaCl (6:1, v:v). La mezcla se incubó sobre hielo durante 1 hora, y se centrifugó a 20.000xg durante 30 minutos. El gránulo de fago se volvió a suspender en 1 ml de PBS.

La agitación en cubeta se repitió una vez más con tubos recubiertos con 10 µg de FGFR-1(IIIb). Las colonias individuales de células infectadas se inocularon dentro de placas de 96 pocillos que contenían 100 µl/pocillo de 2xYTAK, y el fago se desarrolló en presencia de 10 µl de fago ayudante M13KO7 (5×10^{10} pfu/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos sin agitación, seguido de 30 minutos con agitación (100 rpm). Los gránulos de células se prepararon mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos, se volvieron a suspender en 200 µl de 2xYTAK, y se incubaron a 30°C con agitación (100 rpm) durante una noche. A continuación, las placas se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a placas nuevas y se mezclaron con 6x tampón de bloqueo (leche al 18%/PBS) durante 1 hora. Los clones del fago se rastrearon en el ensayo de bloqueo ELISA tal como se describe más adelante. Los clones del bloqueo se seleccionaron y se preparó fago soluble para otra ronda de rastreo usando el ensayo de bloqueo ELISA. Los bloqueadores confirmados se manipularon genéticamente dentro de anticuerpos de tamaño completo.

Ejemplo 3 - Modulación de los niveles de suero

Se examinaron los efectos a corto plazo del anticuerpo FR1-H7 sobre los niveles de suero de insulina, leptina, glucosa, y triglicéridos, mediante la inyección de 4 mg/kg de anticuerpo o de vehículo de control en ratones desnudos atímicos hembra. Las muestras se recogieron y valoraron antes del tratamiento y 6, 24, y 48 horas después del tratamiento. Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), creatina (CPK), nitrógeno de urea en sangre (BUN), proteínas en suero totales, y albúmina en suero usando muestras de suero extraídas 48 después del tratamiento. Los ratones se sacrificaron e igualmente se tomaron pesos de su paquete adiposo paramétrico izquierdo, músculo anterior tibial izquierdo, lóbulo del hígado posterior izquierdo, y bazo.

Ejemplo 4 - Modulación de la ingesta de alimento

Se ensayaron los efectos reductores de peso de los anticuerpos sobre otras cepas de ratones, ratones negros C57 y ratones db/db (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Los ratones C57 se inyectaron con 0,8 mg/kg, 4 mg/kg, y 40 mg/kg de anticuerpo y solución salina de acuerdo con un esquema de rotación un Lunes, Miércoles, Viernes, y siguiente Lunes, midiéndose los pesos corporales antes de cada inyección y el día 9.

Los ratones db/db de 7 semanas de edad se inyectaron subcutáneamente con 4 mg/kg de anticuerpo de acuerdo con un esquema un Lunes, Miércoles, y Viernes, midiéndose los pesos corporales antes de cada inyección y el día 7. La ingesta de alimento se controló igualmente los días 1, 2, 3, 4, y 7. Los animales db/db se sacrificaron el día 7 y se tomaron muestras y se pesaron su grasa parda intraescapular, tejido adiposo blanco epididimario, y tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal.

Ejemplo 5 - Actividad *in vitro* (FR1-H7)

Se llevó a cabo un ensayo ELISA y una inmunoprecipitación usando anticuerpo FR1-H7. Los Fabs se rastrearon de acuerdo con su capacidad para prevenir al FGF de la unión al FGFR-1. La especificidad de unión del anticuerpo se examinó usando un ensayo de unión ELISA, mostrándose los resultados en la Figura 3. El FR1-H7 se une al FGFR-1(IIIb) y -1(IIIc) con fuertes afinidades, pero no reconoce a ninguno de los otros FGFRs. Los resultados de los análisis cinéticos indicaron que el anticuerpo se une a los FGFR-1b e 1-c, igualmente bien. Se determinó que los K_d s de las interacciones eran aproximadamente de 50 pM para ambos receptores.

Ejemplo 6 - Inhibición de la unión del ligando al receptor (FR1-H7)

Las Figuras 4A y 4B muestran el efecto inhibitor del FR1-H7 sobre la unión del ligando al receptor determinada mediante un ensayo de bloqueo ELISA. Se ensayaron dos ligandos de unión del FGFR-1, el FGF-1 (Figura 4A) y FGF-2 (Figura 4B), en el ensayo de bloqueo. Se encontró que el FR1-H7 bloquea igualmente bien el FGFR-1(IIIb) y -

1(IIIc) recombinante en su unión al FGF-1, con IC_{50} s de aproximadamente 5 nM. Igualmente, el anticuerpo bloquea los receptores de la unión al FGF-2, con IC_{50} s dentro del intervalo de 2-5 nM, aunque es ligeramente más potente en la inhibición del FGFR-1(IIIb) que del -1(IIIc). Las actividades de bloqueo al receptor FGFR-1 nativo, completamente activo, se determinaron en el ensayo de bloqueo a base de células. Tal como se muestra en la Figura 5A, la unión total del FGF-2 a las células que expresan el FGFR-1 tiene dos componentes: unión no específica, y unión específica. Esto último explica la mayor parte de la unión total. La Figura 5B muestra que el FR1-H7 inhibe la unión específica del ^{125}I -FGF-2 a las células, y que el bloqueo está próximo a completarse a la concentración de 200 nM. Por estimación, el IC_{50} es menor de 5 nM.

Ejemplo 7 - Señalado de FGFR-1 mediado por ligando, desarrollo de células *in vitro* (FR1-H7)

Bajo condiciones normales, la activación de los FGFRs depende del ligando. El bloqueo de la unión del ligando por FR1-H7 conduce, en consecuencia, a la inhibición de la auto-fosforilación del receptor. Esto se demuestra en la Figura 6, en la cual se ensayó la transferencia Western con anticuerpo anti-fosfo-tirosina para el receptor activado. La mancha superior se ensayó con anticuerpo anti-fosfo-tirosina y la mancha inferior mostró bandas de proteína de control en los lisatos de células mediante la estimación de la carga de gel relativa. Los resultados muestran que el FR1-H7 por sí mismo no activa el receptor, y que inhibe de manera significativa la fosforilación mediada por el FGF-2.

Es sabido que las HUVEC expresan el FGFR-1(IIIb) sobre la superficie de la célula (Feming y Gallagher, (1994). Se ha mostrado que los FGFs estimulan fuertemente el desarrollo de células endoteliales y, en consecuencia, se consideran factores pro-angiogénicos fundamentales. La Figura 7 muestra que el FR1-H7 inhibe la proliferación de HUVECs *in vitro* de una manera que depende de la dosis. Estos resultados demuestran que el FR1-H7 puede usarse como un anti-angiogénico terapéutico en ciertas enfermedades.

En la Figura 8 se muestran los efectos de la vía del FGF sobre la proliferación de adipocitos *in vitro*. El FGF-2 tenía un efecto estimulante profundo sobre el desarrollo de los adipocitos. La proporción de incorporación de timidina fue capaz de un incremento de 10 veces en presencia de FGF-2 (Figura 8A). El FR1-H7 inhibió la proliferación estimulada por el FGF-2 de adipocitos de una manera dependiente de la dosis (Figura 8B).

Ejemplo 8 - Actividad del anticuerpo (FR1-H7)

El FR1-H7 induce pérdida de peso reversible de una manera dependiente de la dosis. La administración tanto s.c. como i.p. de FR1-H7 causó pérdida de peso dependiente de la dosis de los animales (Figura 9). A las dosificaciones las más bajas, 0,19 y 0,4 mg/kg, los ratones que tenían ligeras ganancias de peso idénticas a los animales no tratados o tratados con vehículo. A una dosificación de 1,9 mg/kg, se produjo la pendiente de pérdida de peso de ~20% del peso corporal total dentro de los 3 primeros tratamientos y, posteriormente, los pesos de los animales mostraron una tendencia a la estabilización. La pérdida de peso moderada (~0,5 g) continuó una semana después de la interrupción del tratamiento. Esto fue seguido de una rápida recuperación de los pesos. La recuperación completa se alcanzó 25 días después de la interrupción del tratamiento, y el peso promedio de este grupo fue idéntico al de los grupos de control. A una dosificación superior a 4 mg/kg, el anticuerpo infligió en mismo grado de pérdida de peso independientemente de las dosis. Dentro de los 3 primeros tratamientos se produjo una rápida pérdida de peso, seguido de una gradual estabilización de los pesos. La pérdida de peso máxima ascendió hasta ~1/3 del peso corporal promedio de los controles. La recuperación del peso después de la interrupción de los tratamientos pareció ser dependiente de la dosis. Los tiempos de retardo de las primeras ganancias de peso significativas después de la interrupción del tratamiento fueron de 14 días, 19 días, y 24 días, para el tratamiento con anticuerpo de 4 mg/kg s.c., 40 mg/kg s.c. y 19 mg/kg i.p., respectivamente. Con la excepción de que se eutanizó un animal del grupo de 19 mg/kg debido a una pérdida inusual de peso de ~50% del peso corporal total, todos los ratones de los grupos tratados con anticuerpo recuperaron eventualmente de manera completa sus pesos.

Ejemplo 9 - Ingesta de alimento y comportamiento exploratorio

La ingesta de alimento no en ayunas, medida a lo largo del periodo entre el segundo y tercer tratamiento, se redujo en aproximadamente el 35% en grupos de ratones que perdieron peso, pero no en los grupos de baja dosificación en los cuales no se produjo pérdida de peso. (Figura 10 - Efecto del FR1-H7 sobre la ingesta de alimento en ratones hembra nu/nu). El comportamiento exploratorio de ratones, medido como el número de crianzas por minuto en un nuevo entorno, no fue significativamente alterado por los tratamientos con anticuerpo (Figura 11 - Efecto sobre el comportamiento en la crianza en un nuevo entorno; Media +/- SEM). Esto está de acuerdo con la observación general que no estuvieron moribundos, a pesar de la pérdida dramática de peso.

Ejemplo 10 - Modulación de los niveles de glucosa

El nivel de glucosa en sangre no en ayunas se determinó una semana después de la terminación del tratamiento de anticuerpo. Parece que el anticuerpo redujo la glucosa en sangre de una manera dependiente de la dosis (Figura 12A - Efecto del FR1-H7 sobre glucosa en sangre no en ayunas; Media +/- SEM). La reducción la más alta se produjo en grupos de 19 mg/kg i.p. y 40 mg/kg s.c., que ascendió hasta ~1/3 del nivel de glucosa normal. El día 64, 52 días después del final del tratamiento, se midió nuevamente la glucosa en sangre no en ayunas. Sin embargo, los niveles de glucosa en suero se restablecieron a un intervalo normal el día 64 después que los animales recuperaron

completamente sus pesos corporales (Figura 12B - Efecto del FR1-H7 sobre la glucosa en sangre no en ayunas después de recuperarse completamente los pesos; Media +/- SEM).

Ejemplo 11 - Reducción de tejido adiposo, triglicéridos en suero, insulina, y leptina

Con el fin de estudiar el efecto a corto plazo del FR1-H7, se trataron ratones desnudos con una única inyección de 4 mg/kg de FR1-H7 s.c., y los efectos se controlaron 48 horas después. La Figura 13, que es una gráfica de la pérdida de peso corporal en ratones nu/nu después de una única dosis de tratamiento con FR1-H7 (Media +/- SEM), n=4), mostró que el tratamiento con anticuerpo causó una reducción de peso corporal significativa dentro de las 48 horas. El peso promedio en el grupo tratado con anticuerpo se redujo en aproximadamente un 6% en comparación con el de los grupos de control. Con el fin de investigar la fuente de esta reducción, se tomaron mediciones de pesos de muestras de tejido representativas. Tal como se muestra en la Figura 14 (Efectos sobre los pesos de tejidos después de una única dosis de tratamiento con FR1-H7; cada barra representa el valor calculado como 100x la relación de peso de tejido sobre el peso corporal total; las barras de errores son desviación estándar) se observó una reducción de peso de aproximadamente 60% en el paquete adiposo paramétrico, mientras que los pesos de músculo, hígado, y bazo parecen ser normales.

La Figura 15A-D muestra que el FR1-H7 no afecta al nivel de glucosa en suero 48 después del tratamiento. Sin embargo, los niveles de triglicéridos en suero, insulina, y leptina se redujeron significativamente, lo que indica que el FR1-H7 afecta sistemáticamente el metabolismo energético de los animales. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de ALT, CPK, BUN, proteínas en suero total, y albúmina en suero entre los grupos tratados con anticuerpo y de control, lo que sugiere hígado, músculo y función renal normales, en los animales tratados.

Ejemplo 12 - Inducción de pérdida de peso

La Figura 16 muestra que el tratamiento con FR1-H7 causó una pérdida de peso dependiente de la dosis de ratones negros C57, aunque el efecto es menos dramático en los ratones desnudos. Después de 4 tratamientos, la reducción de peso comparada con los pesos de partida fue de aproximadamente del 5%, 16% y 16% para grupos tratados con 0,8 mg/kg, 4 mg/kg y 40 mg/kg, respectivamente. En ratones db/db, la reducción de peso es incluso más moderada comparada con los ratones desnudos (Figura 17). En el período de 7 días, la reducción de peso se produjo gradualmente y alcanzó aproximadamente el 10% del peso corporal total el Día 7. Esto estuvo acompañado por una reducción gradual en las ingestas de alimento (Figura 18). El análisis de diferentes tejidos adiposos mostró que se produjo una reducción significativa en el tejido graso pardo intraescapular, mientras que los pesos del tejido adiposo blanco epidérmico y del tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal cambió poco (Figura 19). La pérdida de peso más moderada causada por FR1-H7 en ratones db/db puede atribuirse a la deficiencia en la vía de la leptina, o simplemente debido a la abundancia de tejidos grasos en estos animales.

Ejemplo 13 - Aislamiento del anticuerpo (FR1-A1)

Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, con la excepción de que la biblioteca de Fab humano expuesta en un fago procedente de Dynax se dispuso para clones Fab anti-FGFR-1(IIIc), se identificó un anticuerpo específico para anti-FGFR-1(IIIc). El anticuerpo identificado se designó FR1-A1.

Ejemplo 14 - Actividad *in vitro* (FR1-A1)

El FR-A1 muestra fuerte actividad de unión al FGFR-1(IIIc), y moderada afinidad al FGFR-4. Muestra poca unión a todos los otros receptores (Figura 20). Los K_d s frente a estos receptores determinados a partir de análisis cinéticos fueron los siguientes:

FGFR-1b:	>10 μ M
FGFR-1c:	0,7 nM
FGFR-2b:	> 10 μ M
FGFR-2c:	> 10 μ M
FGFR-3b:	> 10 μ M
FGFR-3c:	> 10 μ M
FGFR-4:	90 nM

La Figura 21 muestra los efectos inhibidores del FR1-A1 sobre la unión del receptor del ligando determinados mediante un ensayo de bloqueo ELISA. Se ensayaron dos ligandos de unión del FGFR-1(IIIc), el FGF-1 y FGF-2, en el ensayo de bloqueo. El FR1-A1 bloqueó la unión del FGFR-1(IIIc) al FGF-1 y FGF-2 con IC_{50} s de aproximadamente 5 y 10 nM, respectivamente.

Ejemplo 15 – Inhibición del señalado de FGFR-1(IIIc) mediado por ligando, y desarrollo de células *in vitro* (FR1-A1)

El bloqueo de la unión de ligando por el FR1-A1 conduce consecuentemente a la inhibición de la auto-fosforilación del receptor. Esto se demuestra en la Figura 22, en la cual la transferencia Western de los lisatos de células se ensayó con anti-fosfo-tirosina para el receptor del FGFR-1(IIIc) activado. Los resultados muestran que el FR1-A1 por sí mismo no activó el receptor, pero inhibe de manera significativa la fosforilación del receptor inducido por ligando.

La auto-fosforilación de los receptores del FGFR-1 conduce frecuentemente a la respuesta mitógena de las células a través de la cascada proteína quinasa (MAPK) activada por mitógeno en citoplasma. En consecuencia, la inhibición de la fosforilación del receptor por el FR1-A conduce a la inhibición de la mitogénesis de la célula. Usando análisis por citometría, se encontró que las células G18 expresan receptores de FGFR-1(IIIc) sobre la superficie de la célula. La Figura 23 muestra que la adición de 20 ng/ml de FGF-2 incrementó la proporción de síntesis de ADN en aproximadamente 5 veces comparado con el control, y el anticuerpo disminuyó esta estimulación de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 16 - Inducción de pérdida de peso (FR1-A1)

De manera similar a la observada con el anticuerpo FR1-H7, el FR1-A1 causó una rápida pérdida de peso en ratones desnudos atímicos hembra. Tal como se muestra en la Figura 24, el día 5, después de dos tratamientos, los ratones en el grupo de dosificación de 2 mg/kg, perdieron un promedio de ~9% del peso corporal comparado con el control. Los ratones en el grupo de 20 mg/kg perdieron ~23%. La ingesta de alimento no en ayunas, medida a lo largo del período entre el primer y segundo tratamiento, se redujo en ~14% y ~44% en los grupos de 2 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente (Figura 25).

Ejemplo 17 - Aislamiento del anticuerpo monoclonal (FR1-4H)

Además del FR1-A1 y FR1-H7, se clonó otro anticuerpo FR1-4H específico del FGFR-1 (Figura 28). Mediante análisis BiaCore®, se determinó que el KDa de este anticuerpo al FGFR-1(IIIb) era de 1,1 nM. En comparación, el KDa al FGFR-1(IIIc) fue mayor de 10 µM. En consecuencia, el FR1-4H se consideró que era específico únicamente para la forma de corte y empalme b del FGFR-1. Al igual que el FR1-A1 y FR1-H7, el FR1-4H es un anticuerpo neutralizante, el cual bloquea el receptor de la unión al ligando (Figura 20). Por ello, se dedujo que el FR1-4H proporcionaría muchos efectos similares a los mostrados por los otros dos anticuerpos FGFR-1, tal como se han descrito anteriormente.

El FR1-A1 y FR1-H7 mostraron alta afinidad de unión frente al FGFR-1, y baja afinidad de unión frente al FGFR-4. Ambos anticuerpos podrían inhibir potencialmente la activación inducida por ligando del FGFR-1. En animales, los dos anticuerpos produjeron fenómenos de pérdida de peso casi idénticos, acompañados por una reducción significativa de la ingesta de alimento. A partir de las características comunes de estos dos anticuerpos, puede concluirse que otros antagonistas del FGFR son capaces de inducir reducción de peso a través de un efecto anoréxico relacionado con la vía del FGFR-1 o FGFR-4.

Los procedimientos para aislar y clonar el FR1-4H son idénticos a los del FR1-A1 y FR1-H7, tal como se han descrito en los Ejemplos 2 y 12, excepto que los candidatos a fago durante el procedimiento de rastreo se seleccionaron para unión específica al FGFR-1(IIIb) en lugar del FGFR-1(IIIc).

Ejemplo 18 - Ensayo de bloqueo ELISA para FR1-4H

Este experimento se ha descrito ampliamente en los Ejemplos 6 y 14, excepto que en todas las ocasiones se usó proteína recombinante FGFR-1(IIIb) en lugar de FGFR-1(IIIc). El FR1-4H inhibió la unión del FGFR-1(IIIb) al ligando FGF (Figura 29). El por ciento de unión se determinó usando el ensayo de bloqueo ELISA descrito en los Ejemplos 6 y 14. El por ciento de unión se redujo estadísticamente mediante tratamiento con el FR1-4H sobre el control anterior en 1 nM.

Ejemplo 19 - Inhibidores de molécula pequeña del FGFR

Muchas moléculas pequeñas inhiben la actividad quinasa del FGFR; en la Figura 30 se muestran unos pocos ejemplos. Se ensayaron los dos derivados pirimidino-piridina.

Se recubrió péptido polyE-Y (Sigma, St. Louis, Missouri) en un placas de microvaloración Immulon® 2B de 96 pocillos (ThermoLab Systems, MA) mediante incubación de 50 µl/pocillo de la solución (5 µg/ml en PBS) durante 12 horas a 4°C. A continuación, la solución se dispuso, y la placa se lavó dos veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS, Tween-20 al 0,1%). A continuación, las soluciones siguientes se mezclaron en cada pocillo: 25 µl de tampón de reacción (Hepes 100 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 10 mM y DTT 1 mM, pH 7,5), 2 µl de solución de compuesto (varias concentraciones en DMSO) y 20 µl solución de proteína recombinante de dominio quinasa de FGFR (100 ng/µl). Después de 5 minutos de incubación, se agregaron 4,5 µl/pocillo de solución ATP (40 µM) y la reacción se dejó desarrollar durante 20 minutos a 28°C. La reacción se interrumpió mediante lavado de la placa 3 veces con el tampón de lavado. A continuación, la placa se bloqueó con 3% de BSA en PBS durante 1 hora. La fosforilación de

los péptidos poliE-Y se detectó usando anticuerpo PY-20-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) tal como describe el fabricante del anticuerpo. Los datos brutos se trataron usando un desarrollo aritmético hecho a la medida para generar un valor IC₅₀ para cada compuesto.

5 Ambos derivados pirimido-piridinas inhibieron las actividades quinasa de todos los FGFRs en un ensayo enzimático (Tabla 1). En un ensayo a base de células, se encontró que estos dos compuestos inhibían de manera potente la fosforilación inducida por ligando del receptor FGFR-1c (Figura 31). Dado que estos compuestos mostraron actividad antagonista frente al FGFR-1, y en menor extensión, al FGFR-4, estos deberían compartir las mismas propiedades inductoras de pérdida de peso en animales con anticuerpos FR1-A1 y FR1-H7.

10 Tabla 1. Inhibidores de molécula pequeña del FGFR inhibieron las actividades enzimáticas quinasa *in vitro*. Los valores son IC₅₀s determinados usando el ensayo enzimático descrito en Procedimientos.

	Derivado pirimido-piridinas A	Derivado piridino-piridinas B
FGFR-1	18 nM	20 nM
FGFR-2	60 nM	N/A
FGFR-3	20 nM	3 nM
FGFR-4	440 nM	360 nM

Ejemplo 20 – Ensayo de fosforilación para Inhibidores de molécula pequeña

15 El ensayo de fosforilación para moléculas pequeñas es esencialmente el mismo que el ensayo de fosforilación descrito en los Ejemplos 7 y 15 y en el Ensayo de fosforilación, excepto que se usaron compuestos de molécula pequeña en lugar de anticuerpos FGFR-1 en todas las ocasiones. Los inhibidores de molécula pequeña de FGFR inhibieron la auto-fosforilación del FGFR-1(IIIc) en un ensayo de fosforilación a base de células (Figura 31). Se aplicaron cantidades iguales de lisatos de células a cada banda de muestra. La auto-fosforilación del receptor se ensayó usando anticuerpo anti-fosfo-tirosina tal como se describe en la patente original.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 CDRs para secuencias de aminoácidos de FR1-H7

VH (Subclase I de cadena pesada humana)

CDR1 SEC ID NO:1 DYYMH

CDR2 SEC ID NO:2 LVPPEDGETIYAEKFQF

CDR3 SEC ID NO:3 DDYMDV

25 VL (Subgrupo III de cadena ligera kappa humana)

CDR1 SEC ID NO:4 RASQSVSGSALA

CDR2 SEC ID NO:5 DASSRAT

CDR3 SEC ID NO:6 QQYGSSPLT

Región variable de cadena pesada de FR1-H7

30 Secuencia de aminoácido

SEC ID NO:7

MAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTFTDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGET
IYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVVYCARDYMDVWGKGTILVTSSAST
KGP

Región variable de cadena ligera de FR1-H7

Secuencia de aminoácido

35 SEC ID NO:8

LETTLTQSPDTLSLSPGEGATLSCRASQSVSGSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGV
PDRFSGSGSGADFSLTISRLEPEDFAVYSCQOYGSPLTFGPGTKVDVKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

CDRs para secuencias de aminoácidos de FR1-A1

VH (Subclase I de cadena pesada humana)

CDR1 SEC ID NO:9 GYYMH

5

CDR2 SEC ID NO:10 RIIPILGIANYAQKFQG

CDR3 SEC ID NO:11 GGD LGGMDV

VL (Subgrupo III de cadena ligera kappa humana)

CDR1 SEC ID NO:12 RSSQSLRHSNGYNYLD

CDR2 SEC ID NO:13 LASNRAS

10

CDR3 SEC ID NO:14 MQALQIPPT

Región variable de cadena pesada de FR1-A1

Secuencia de aminoácido

SEC ID NO:15

MAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGQTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIA

15

NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGDLGGMDVWGQG

Región variable de cadena ligera de FR1-A1

Secuencia de aminoácido

SEC ID NO:16

LEIVLTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLRHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLASNR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQIPPTFGPGTKVDIKRTVAA

20

CDRs para secuencias de aminoácidos de FR1-4H

Cadena pesada variable

CDR1 SEC ID NO:17 SYYWS

CDR2 SEC ID NO:18 YIYYSGSTNYPNPSLKS

CDR3 SEC ID NO:19 EYYYDSSGYFYAFDI

25

Cadena ligera variable

CDR1 SEC ID NO:20 SGSSSNIGSNYVY

CDR2 SEC ID NO:21 RNNQRPS

CDR3 SEC ID NO:22 AAWDDSLSGWW

Región variable de cadena pesada de FR1-4H

30

Secuencias de aminoácidos

SEC ID NO:23

QVQLVEFGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGY	50
IYYSGSTNYPNPSLKSRVAISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREYY	100
YDS SGYYFYAFDIWGQGTTVTVSS	124

Región variable de cadena ligera

Secuencia de aminoácido

SEC ID NO:24

LPVLTQPPSASGTPGQRVSI SC SGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIF	50
RNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWV	100
FGGGTKLTVLG	111

5

CDRs para secuencias de ácido nucléico de FR1-H7

VH (Subclase I de cadena pesada humana)

CDR1 SEC ID NO:25 GACTACTACATGCAC

CDR2 SEC ID NO:26

10

CTTGTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCAGA GAAGTTCCAGGGC

CDR3 SEC ID NO:27 GATGACTACATGGACGTC

VL (Subgrupo III de cadena ligera kappa humana)

CDR1 SEC ID NO:28 AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCAGTGCGTTGGCC

CDR2 SEC ID NO:29 GATGCATCCAGTAGGGCCACT

15

CDR3 SEC ID NO:30 CAGCAATATGGTAGCTCACCTCTCACT

Región variable de secuencia de ADN de cadena pesada de FR1-H7

SEC ID NO:31

ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTTTCCTGCAAGGTTTCTGGATACACCTTCACCGACTACTACATGCACTGGGTGCAA
CAGGCCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTTGTGATCCTGAAGATGGTGAAACA
ATCTACGCAGAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATAACCGCGGACACGTCTACAGACACA
GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
GATGACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACC
AAGGGCCCA

Región variable de secuencia de ADN de cadena ligera de FR1-H7

20

SEC ID NO:32

CTTGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGGAGAAGGAGCC
ACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCAGTGCGTTGGCCTGGTACCAGCAG
AAACCTGGCCAGGCTCCAGACTCCTCATCTATGATGCATCCAGTAGGGCCACTGGCGTC
CCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGACTTCAGTCTCACCATCAGCAGACTG
GAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTCCTGTGAGCAATATGGTAGCTCACCTCTCACTTTC
GGCCCTGGGACCAAAGTGGATGTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAC
TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATT

CDRs para secuencias de ácido nucléico de FR1-A1

VH (Subclase I de cadena pesada humana)

CDR1 SEC ID NO:33 GGCTACTATATGCAC

CDR2 SEC ID NO:34

5 AGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAAC TACGCACAGAAGTTCCAGGGC

CDR3 SEC ID NO:35 GGAGGAGATCTGGGCGGTATGGACGTC

VL (Subgrupo III de cadena ligera kappa humana)

CDR1 SEC ID NO:36

AGGTCTAGTCAGAGCCTCCGGCATAGTAAT GGATAACAACCTATTTGGAT

10 CDR2 SEC ID NO:37 TTGGCTTCTAATCGGGCCTCC

CDR3 SEC ID NO:38 ATGCAAGCTCTACAATTCCTCCGACT

Región variable de cadena pesada de FR1-A1

Secuencia de ADN

SEC ID NO:39

**ATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATCGACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGA
CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCA
AACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACA
GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGA
GGAGGAGATCTGGGCGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGA**

15

Región variable de cadena ligera de FR1-A1

Secuencias de ADN

SEC ID NO:40

**CTTGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCC
TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCGGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGAT
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGCTTCTAATCGG
GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAATT
CCTCCGACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAAGTGTGGCTGCA**

20 CDRs para secuencias de ácido nucléico de FR1-4H

Cadena pesada variable

CDR1 SEC ID NO:41 AGTTACTACTGGAGC

CDR2 SEC ID NO:42

TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGT

25 CDR3 SEC ID NO:43

GAGTATTACTATGATAGTAGTGTTATTACTTTTATGCTTTTGATATC

Cadena ligera variable

CDR1 SEC ID NO:44 TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC

CDR2 SEC ID NO:45 AGGAATAATCAGCGGCCCTCA

CDR3 SEC ID NO:46 GCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTG

Región variable de cadena pesada de FR1-4H

5 Secuencias de ADN
 SEC ID NO:47

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTTTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC	50
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACT	100
GGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTAT	150
ATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGT	200
CGCCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT	250
CTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTATTAC	300
TATGATAGTAGTGGTTATTACTTTTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGG	350
GACCACGGTCACCGTCTCAAGC	372

Región variable de cadena ligera

10 Secuencia de ADN
 SEC ID NO:48

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAG	50
GGTCTCCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATG	100
TATACTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTTT	150
AGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAA	200
GTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG	250
AGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTG	300
TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT	333

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo purificado, o un fragmento del mismo, el cual se une específicamente a un dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc), y neutraliza la activación del receptor, en el que el anticuerpo comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) SEC ID NO:9 (VHCDR1), SEC ID NO:10 (VHCDR2), SEC ID NO:11 (VHCDR3), SEC ID NO:12 (VLCDR1), SEC ID NO:13 (VLCDR2) y SEC ID NO:14 (VLCDR3).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo, o fragmento del mismo, inhibe la unión de un ligando del FGFR-1(IIIc) o FGFR-4(IIIc) a su receptor.
3. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo comprende al menos una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEC ID NO:15 o una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO:16.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo comprende al menos una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEC ID NO:15 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO:16.
5. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5, ligado de manera operable a una secuencia de control.
7. Una célula huésped aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6.
8. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 7, bajo condiciones que permiten la expresión del anticuerpo.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el procedimiento comprende además la purificación del anticuerpo.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.
11. Uso de un antagonista del FGFR-1(IIIc) y FGFR-4(IIIc) en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la obesidad, un estado resultante de o agravado por la obesidad, diabetes, o un estado resultante de o agravado por la diabetes, en el que el antagonista es un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el estado es hipertensión o una enfermedad cardiovascular.

Fig. 1A. Secuencia de ADN y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del FR1-H7

Secuencia de la región variable de la cadena pesada (ADNc)

**ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGTTTCTGGATACACCTTCACCGACTACTA
CATGCACTGGGTGCAACAGGCCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTT
GTTGATCCTGAAGATGGTGAACAATCTACGCAGAGAAGTTCCAGGGCAGAG
TCACCATAACCGCGGACACGTCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG
CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGACTACATG
GACGTCTGGGGCAAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGG
GCCCA**

Secuencia de la región variable de la cadena pesada (aminoácido)

**MAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTDYYMHWVQQAPGKGLEWMG
LVDPEĐGETFYAEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCARDYMD
VWGKGTLVTVSSASTKGP**

Fig. 1B. Secuencia de ADN y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del FR1-H7

Secuencia de la región variable de la cadena ligera (ADNc)

**CTTGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGGAGA
AGGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCAGTGCGTTG
GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATGATG
CATCCAGTAGGGCCACTGGCGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
GGCAGACTTCAGTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTCCTGTCAGCAATATGGTAGCTCACCTCTCACTTTCGGCCCTGGGACCAA
AGTGGATGTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATT**

Secuencia de la región variable de la cadena ligera (aminoácido)

**LETTLTQSPDTLSLSPGEGATLSCRASQSVSGSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASS
RATGVPDRFSGSGSGADFSLTISRLEPEDFAVYSCQQYGSSPLTFGPGTKVDVKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD**

Fig. 1C. CDRs para secuencias de ácido nucleico de FR1-H7

VH (Subclase I de la cadena pesada humana)

CDR1 GACTTACTACATGCAC

CDR2 CTTGTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCAGAGAAGTTCCAGGGC

CDR3 GATGACTACATGGACGTC

VI (Subgrupo III de la cadena ligera kappa humana)

CDR1 AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCAGTGCGTTGGCC

CDR2 GATGCATCCAGTAGGGCCACT

CDR3 CAGCAATATGGTAGCTCACCTCTCACT

Fig. 1D. CDRs para secuencias de aminoácido de FR1-H7

VH (Subclase I de la cadena pesada humana)

CDR 1 DYYMH

CDR2 LVDPEDGETIYEKFG

CDR3 DDYMDV

VL (Subgrupo III de la cadena ligera kappa humana)

CDR1 RASQSVSGSALA

CDR2 DASSRAT

CDR3 QQYGSSPLT

Fig. 2A. Secuencia de ADN y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del FR1-A1

Secuencia de la región variable de la cadena pesada (ADNc)

**ATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT
CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATCGACCTTCACCGGCTACTAT
ATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGG
ATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACACGACAGAAAGTTCCAGGGCAGAG
TCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG
CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGGAGGAGATCTG
GGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA**

Secuencia de la región variable de la cadena pesada (aminoácido)

**MAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGQTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMG
RIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGDLGG
MDVWGQG**

Fig. 2B. Secuencia de ADN y de aminoácido de la cadena ligera del FR1-A

Secuencia de la región variable de la cadena ligera (ADNc)

**CTTGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCGGCATAGTAATGGA
TACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCT
GATCTATTTGGCTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAAGTGGCA
GTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA
TGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAATTCCTCCGACTTTCGGCC
CTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCA**

Secuencia de la región variable de la cadena ligera (aminoácido)

**LEIVLTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLRHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL
ASNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQIPPTFGPGTKVD
IKRTVAA**

Figura 2C. CDRs para secuencias de ácido nucléico del FR1-A1

VH (Subclase I de la cadena pesada humana)

CDR1 GGCTACTATATGCAC

CDR2 AGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACACGACAGAAAGTTCCAGGGC

CDR3 GGAGGAGATCTGGGCGGTATGGACGTC

VL (Subgrupo II de la cadena ligera kappa humana)

CDR1 AGGTCTAGTCAGAGCCTCCGGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGAT

CDR2 TTGGCTTCTAATCGGGCCTCC

CDR3 ATGCAAGCTCTACAAATTCCTCCGACT

Figura 2D. CDRs para secuencias de aminoácidos del FR1-A1

VH Subclase I de la cadena pesada humana)

CDR1 GYYMH

CDR2 RIIPILGIANYAQKFQG

CDR3 GGD LGGMDV

VL (Subgrupo II de la cadena ligera kappa humana)

CDR1 RSSQSLRHSNGYNYLD

CDR2 LASNRAS

CDR3 MQALQIPPT

Fig. 3

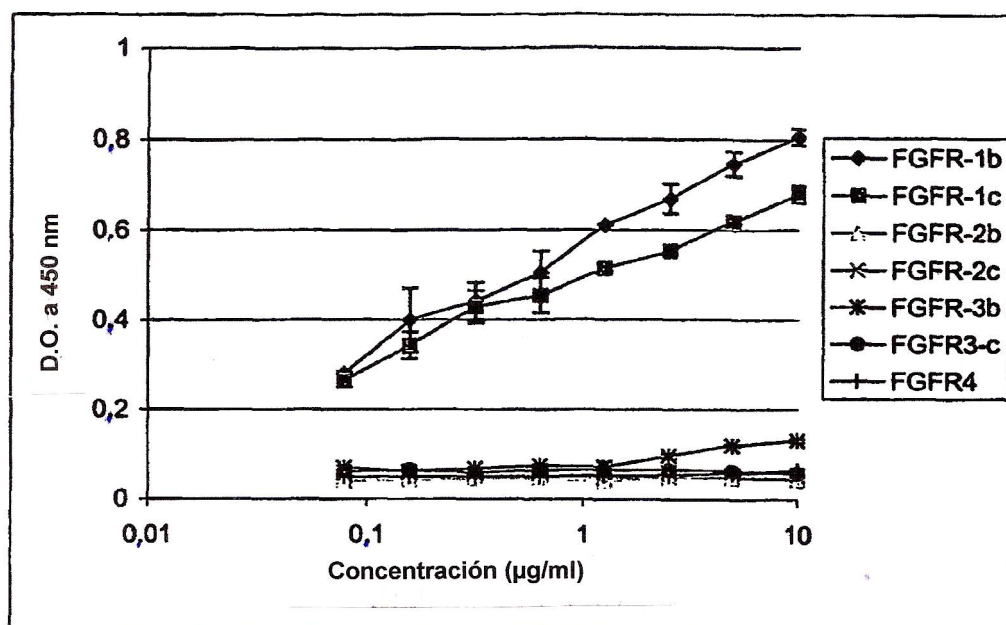


Fig. 4A

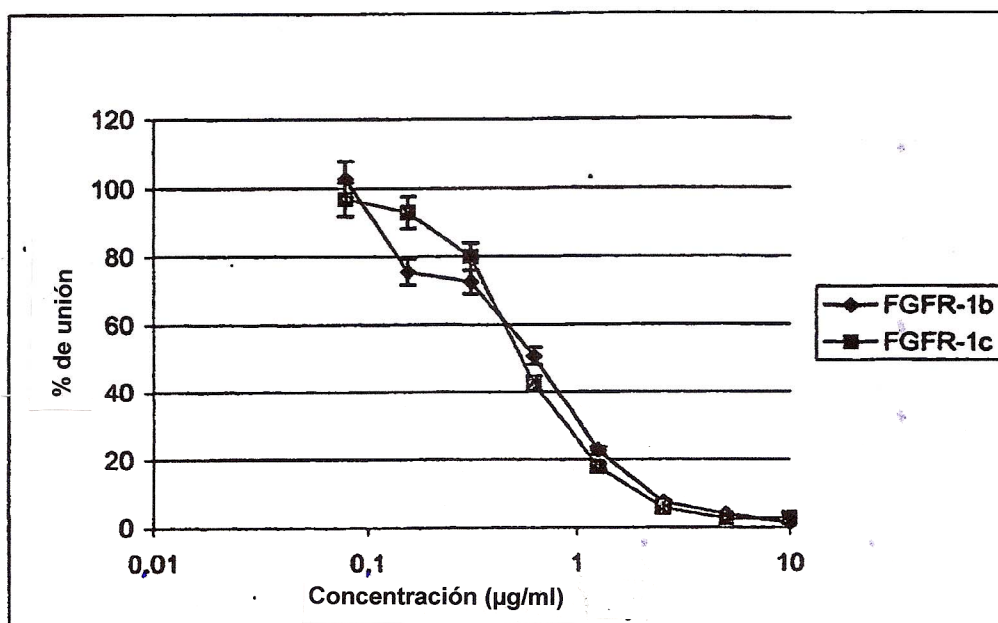


Fig. 4B

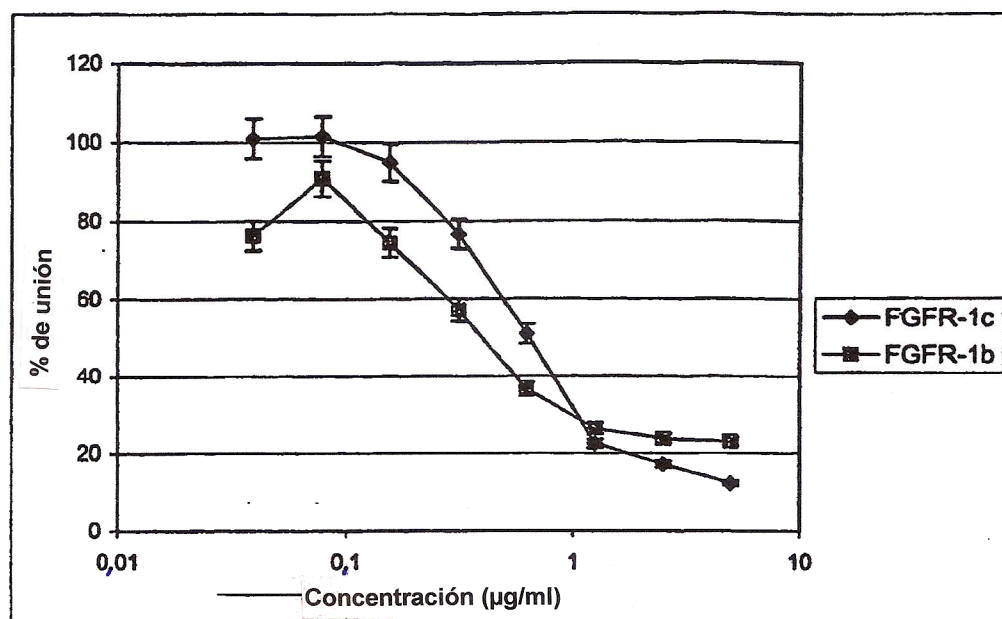


Fig. 5A

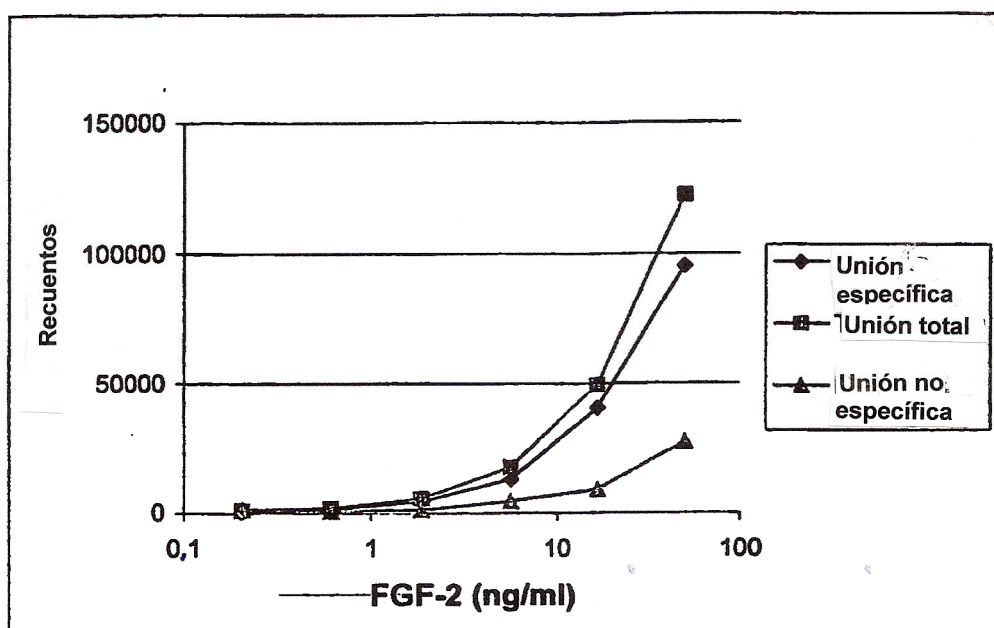


Fig. 5B

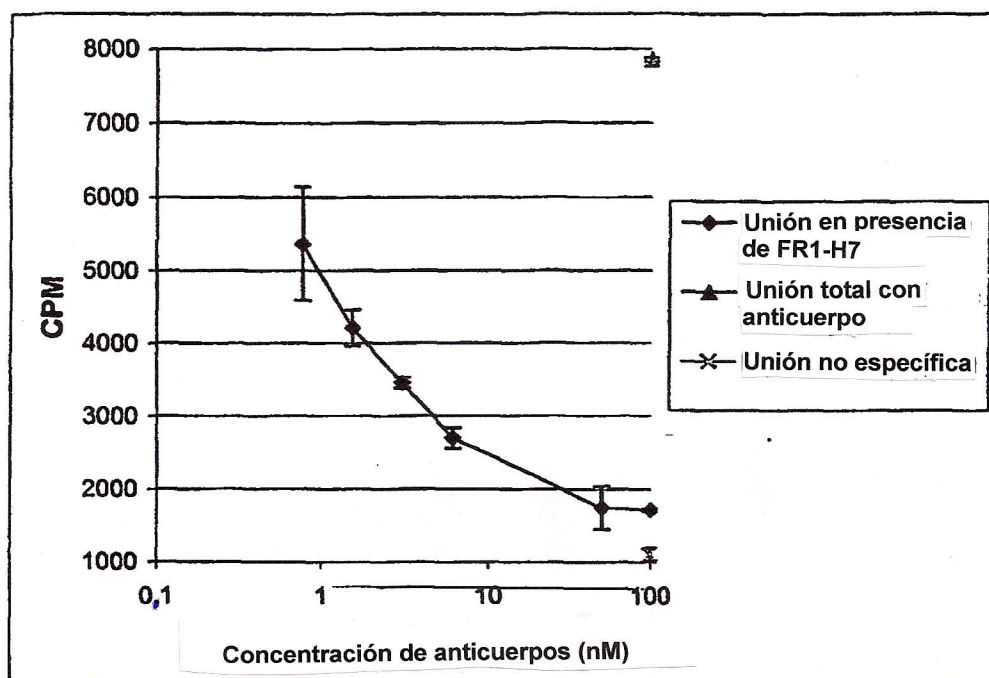


Fig. 6

FGF-2	-	20	20	-
(ng/ml)				
FR1-H7	-	30	-	30
(μ g/ml)				

Peso molecular
del marcador

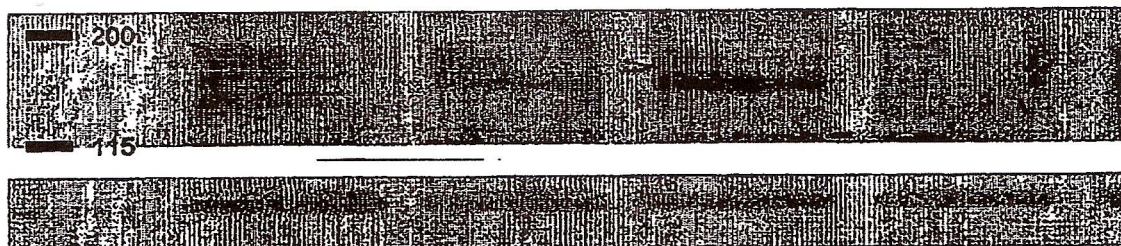


Fig. 7

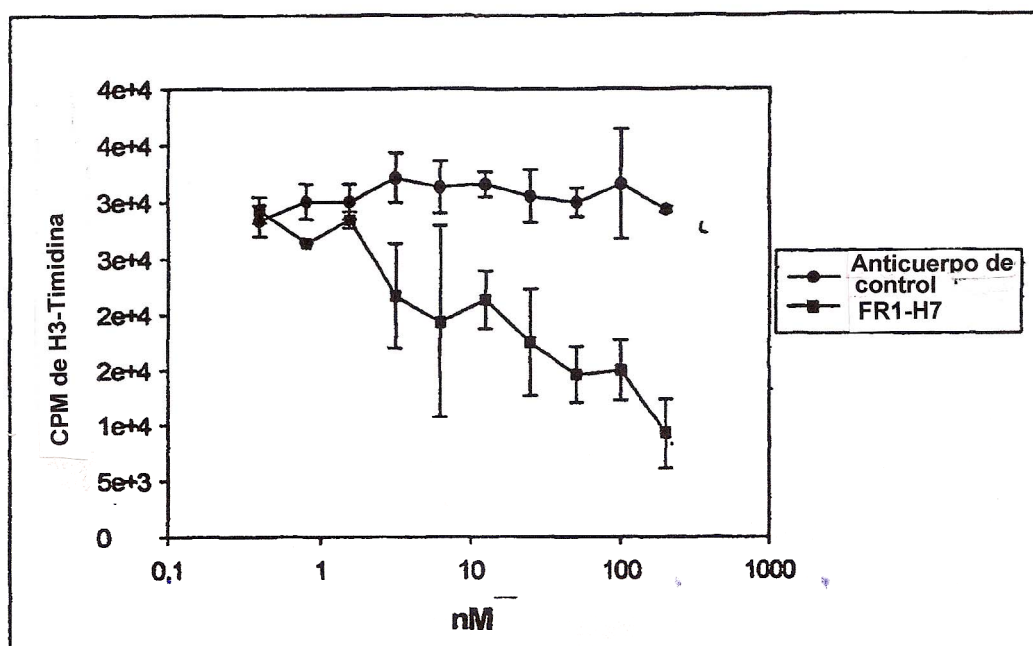


Fig. 8A

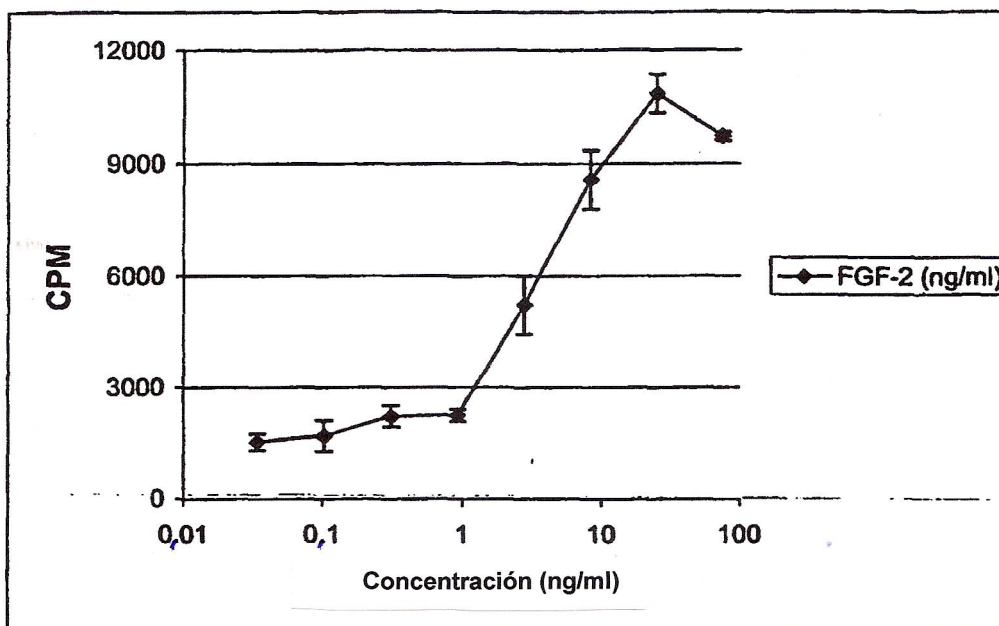


Fig. 8B

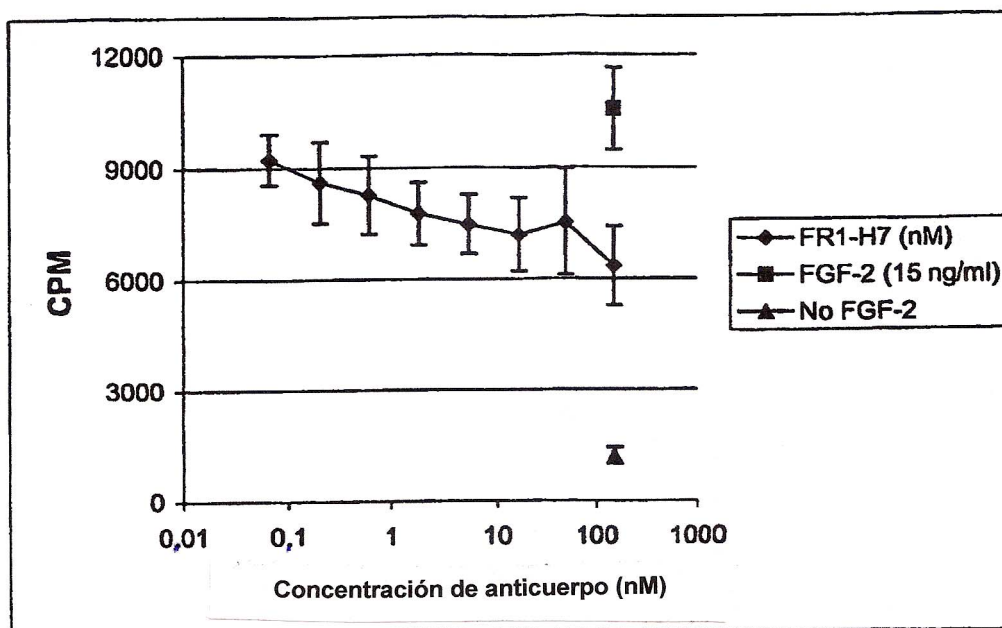
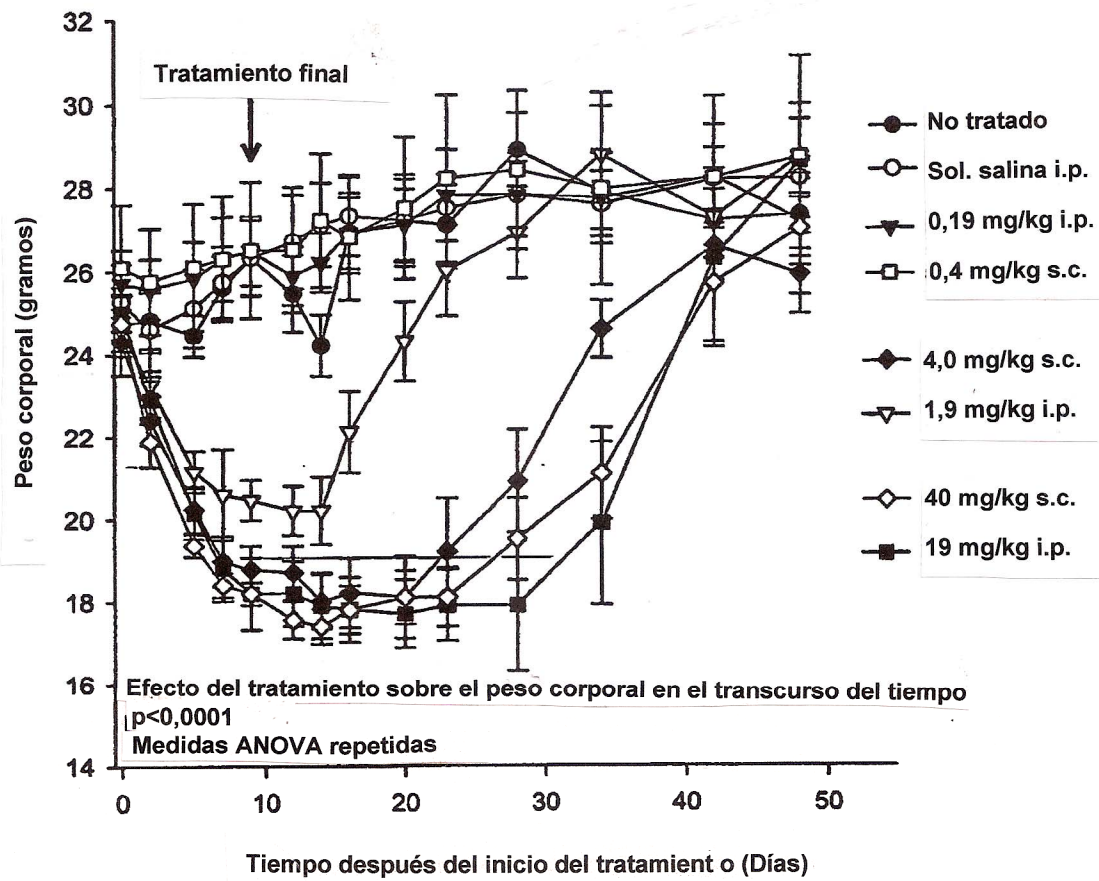


Fig. 9



*13 gramos del ratón eutanizado

Fig. 10

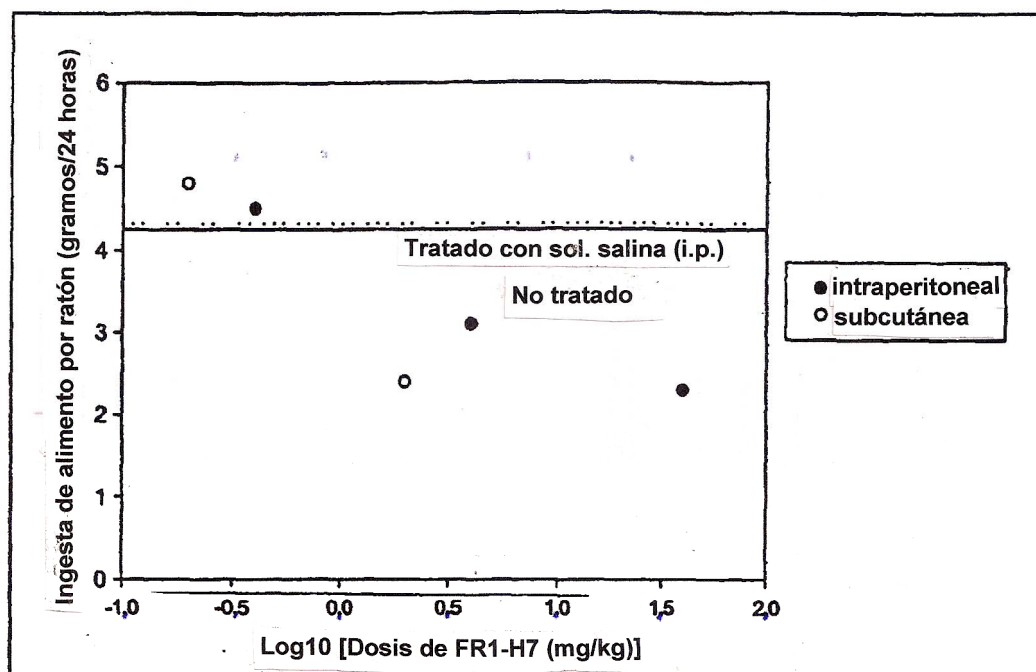


Fig. 11

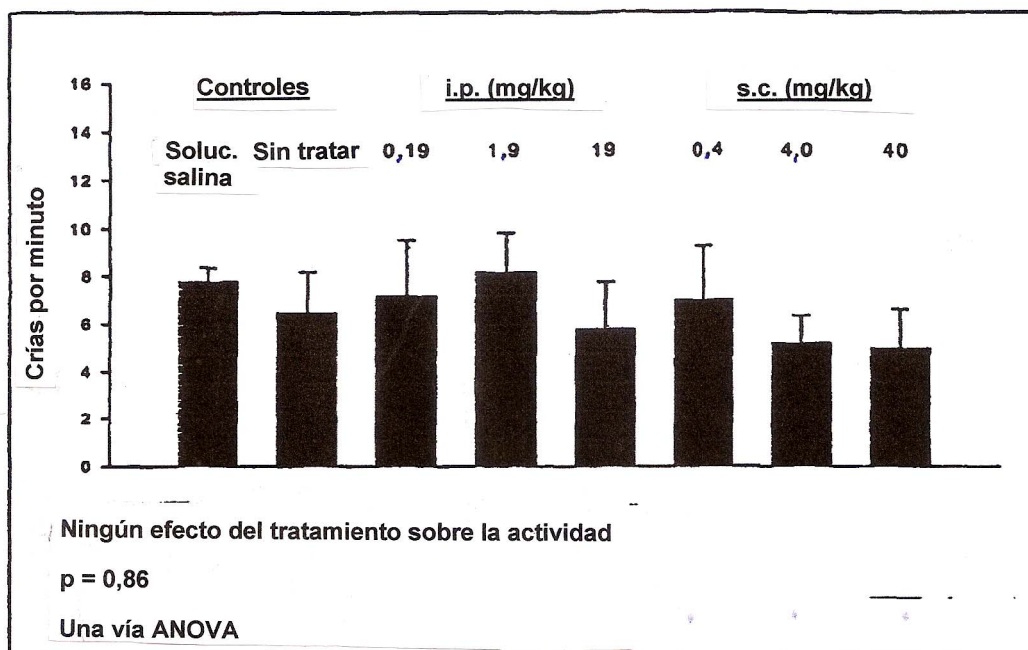


Fig. 12A

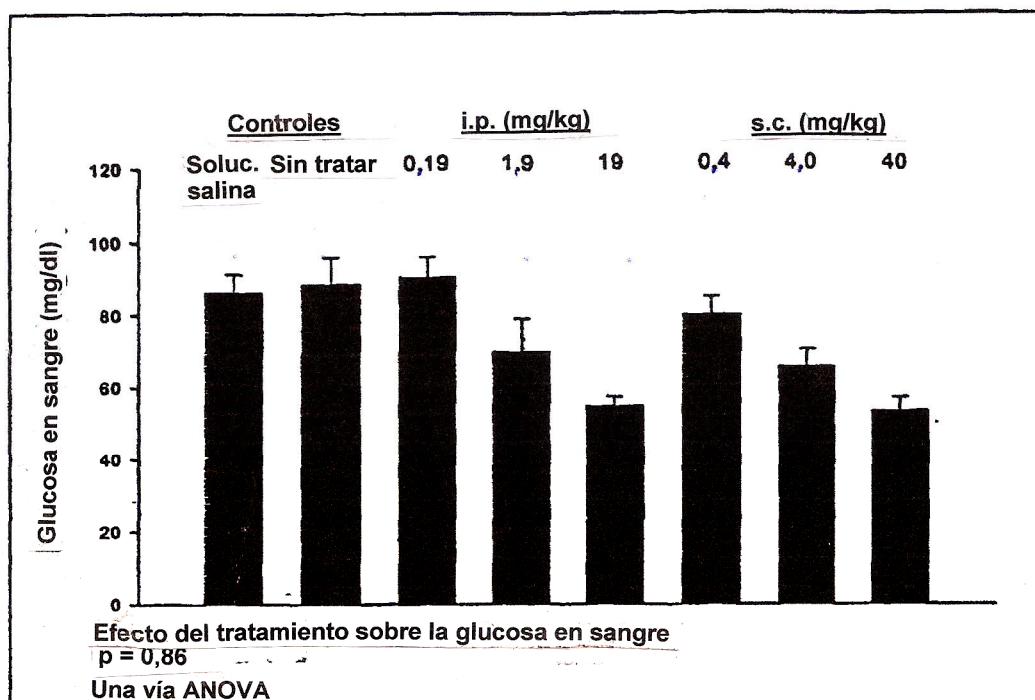


Fig. 12B

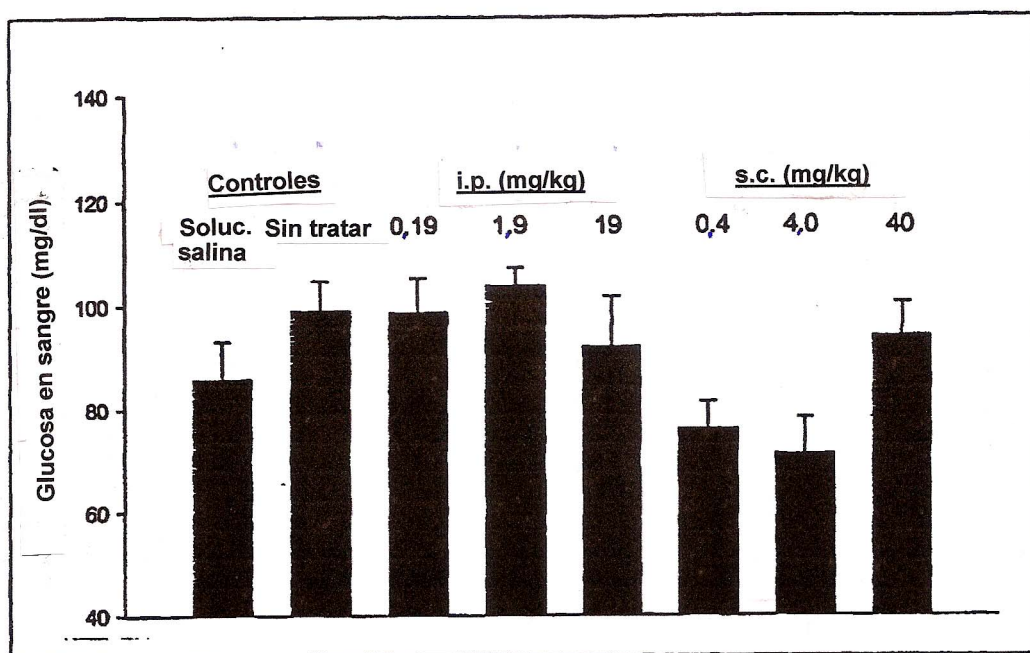


Fig. 13

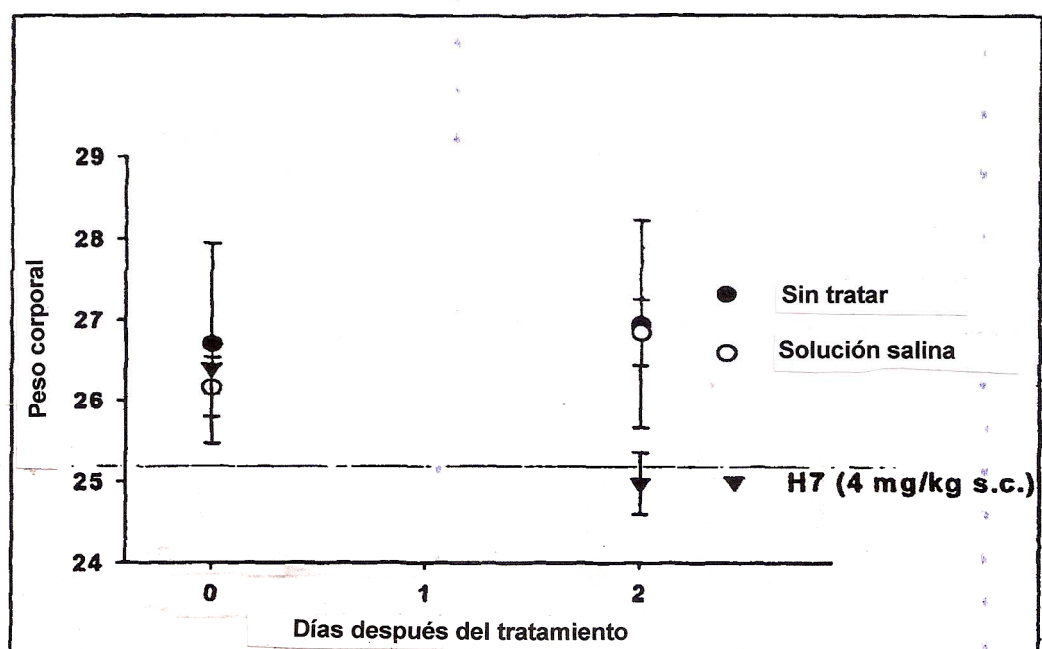
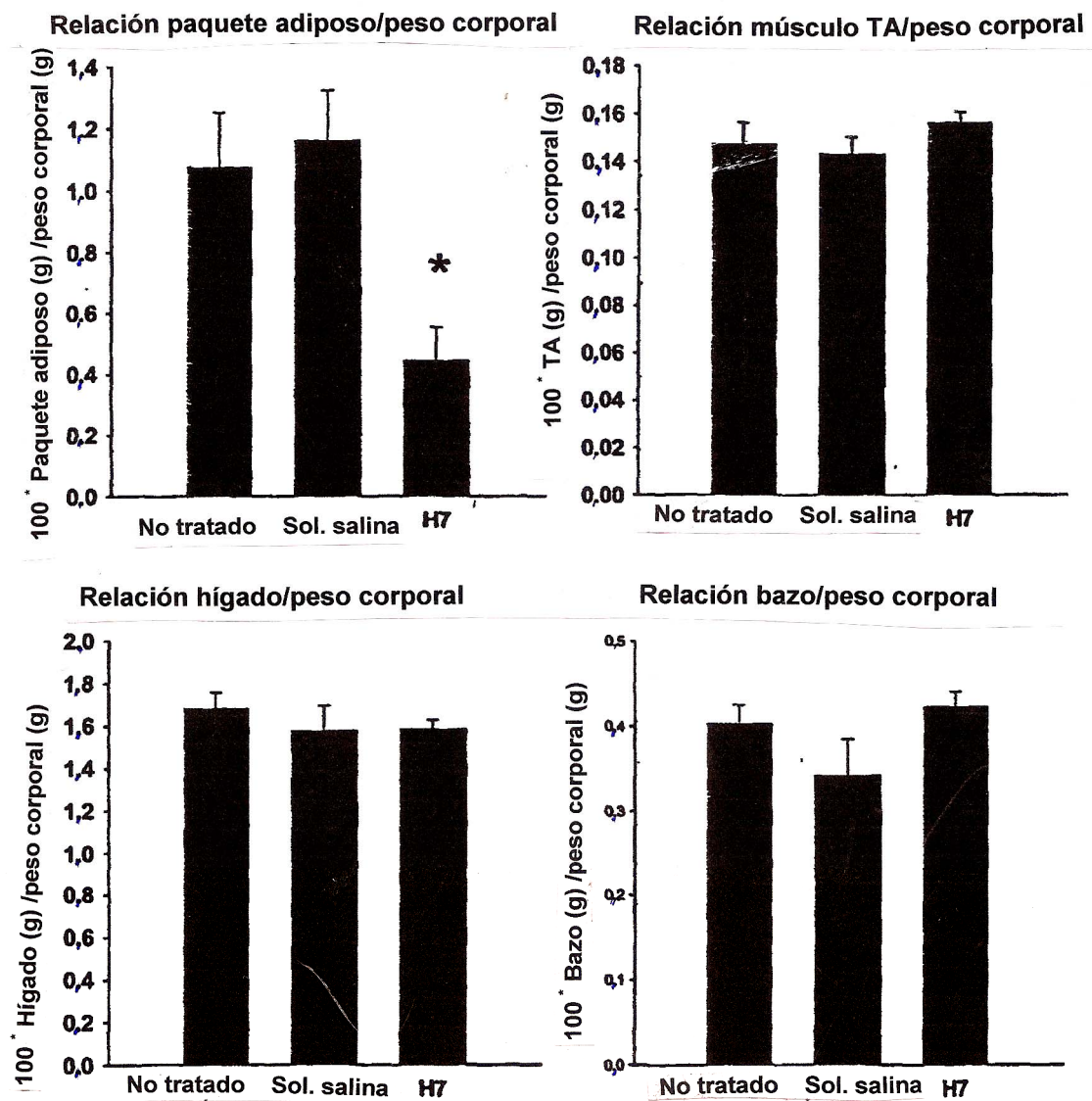


Fig. 14



*
p<0.05

Fig. 15A

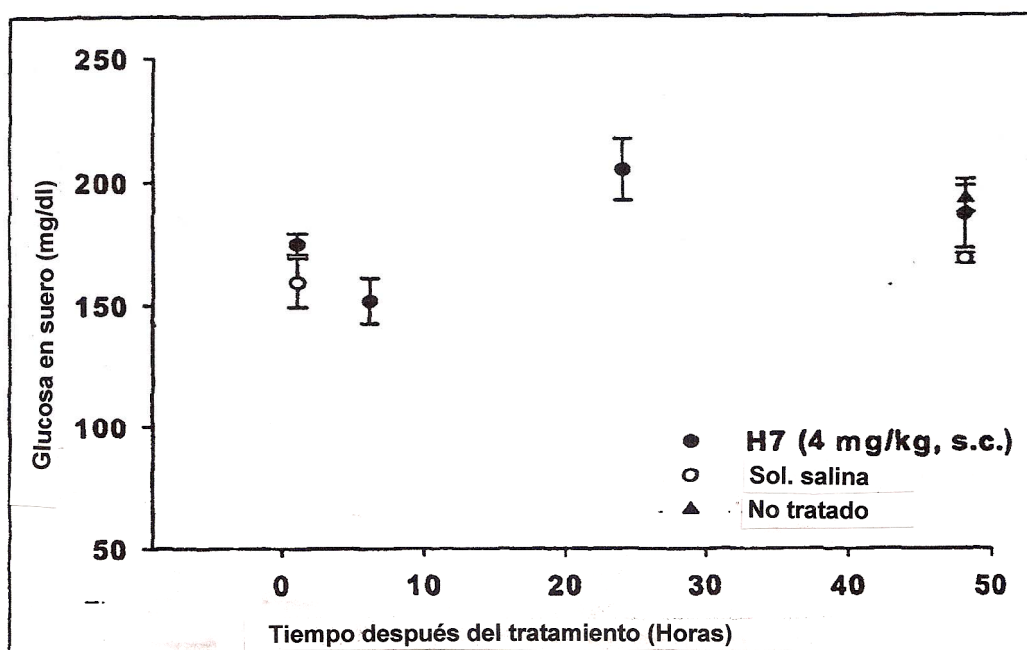


Fig. 15B

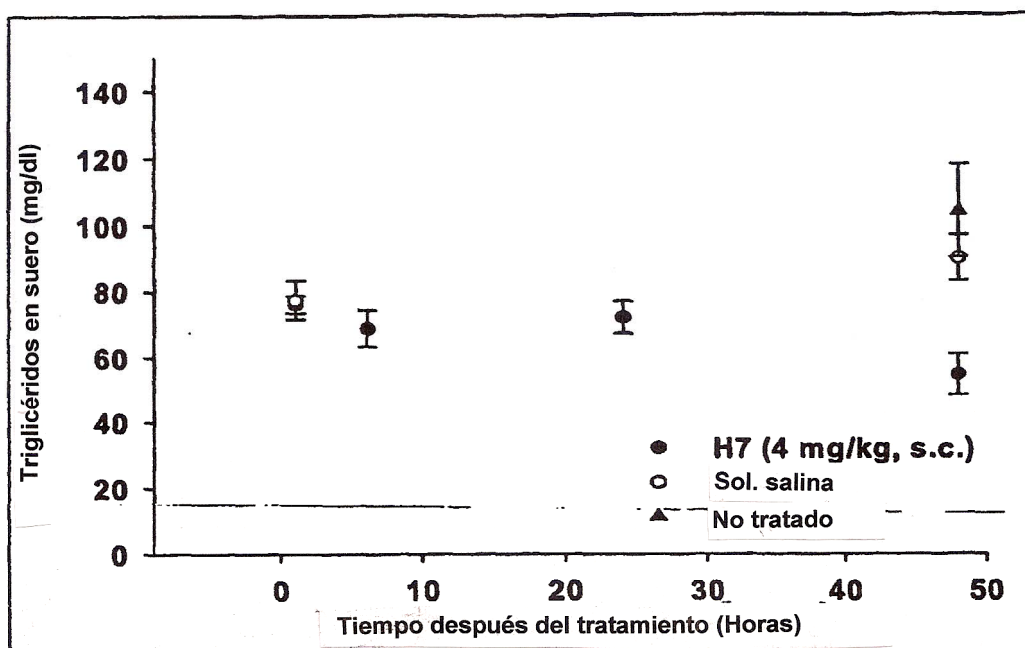


Fig. 15C

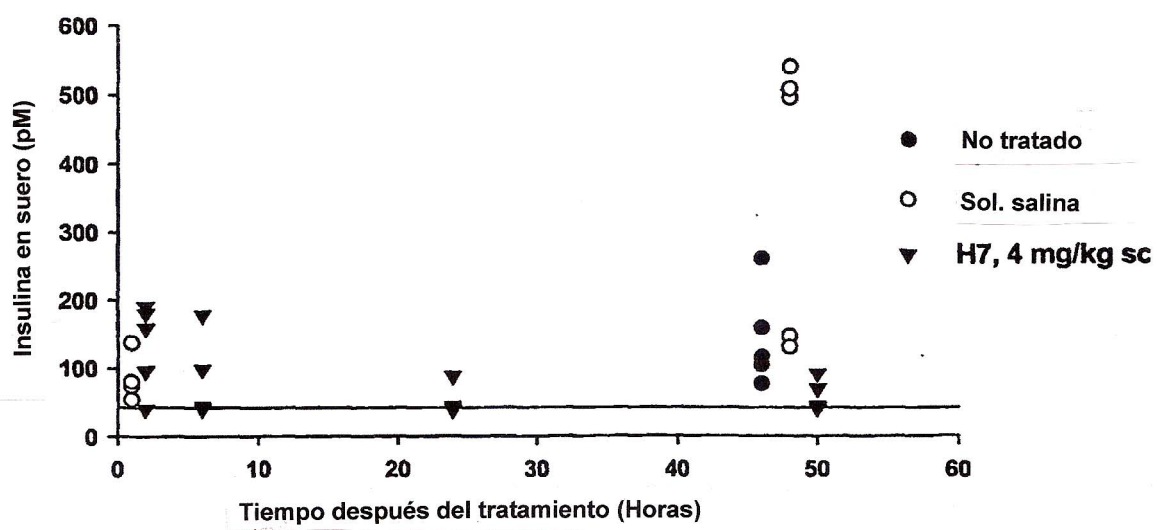


Fig. 15D

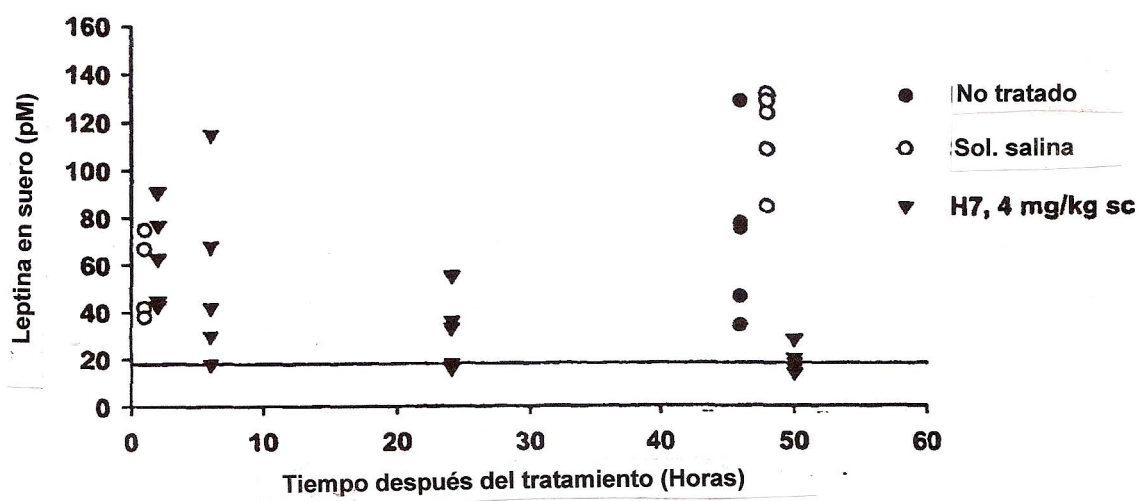


Fig. 16

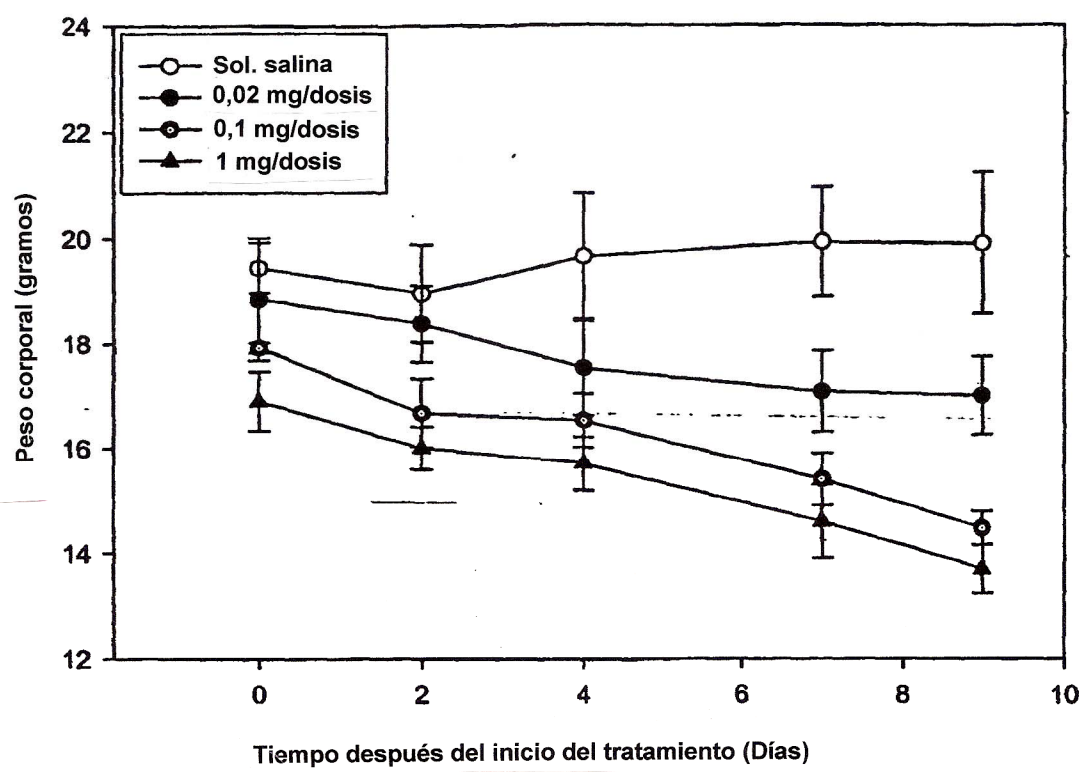


Fig. 17

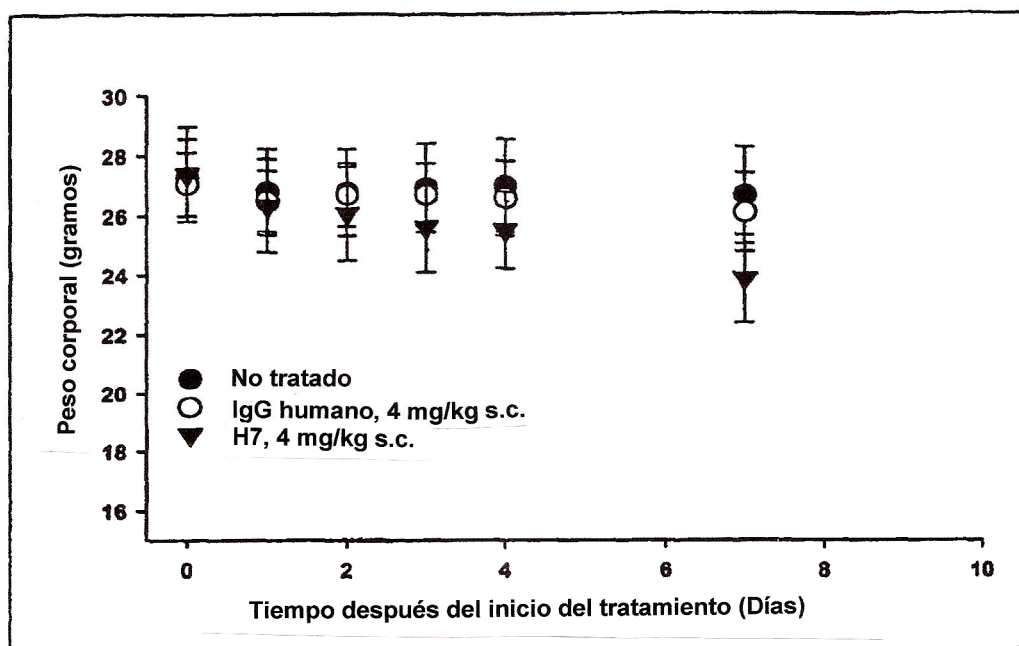


Fig. 18

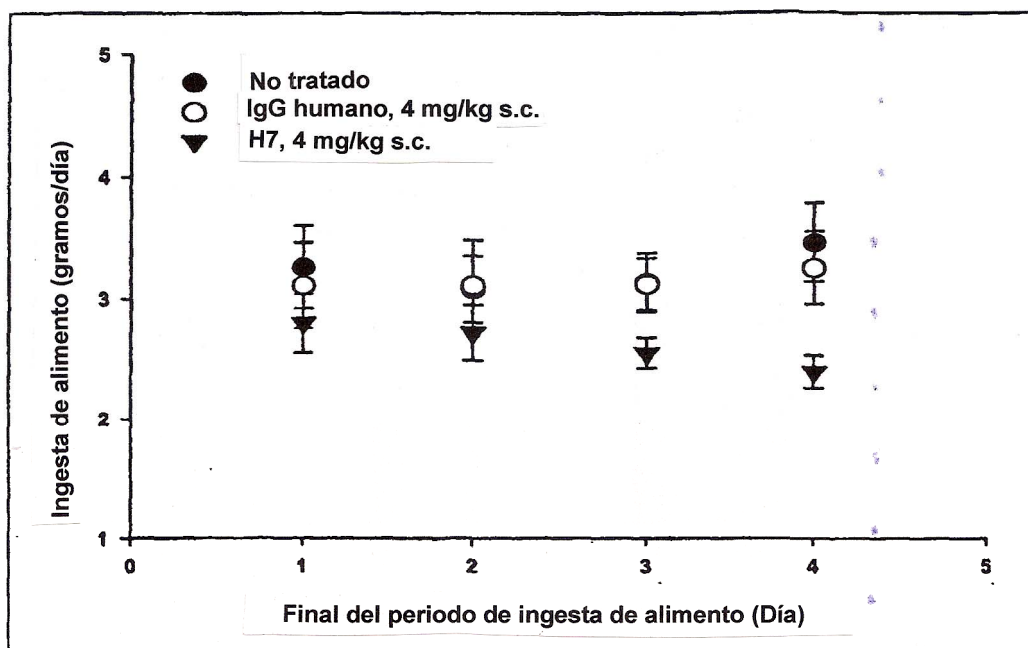


Fig. 19

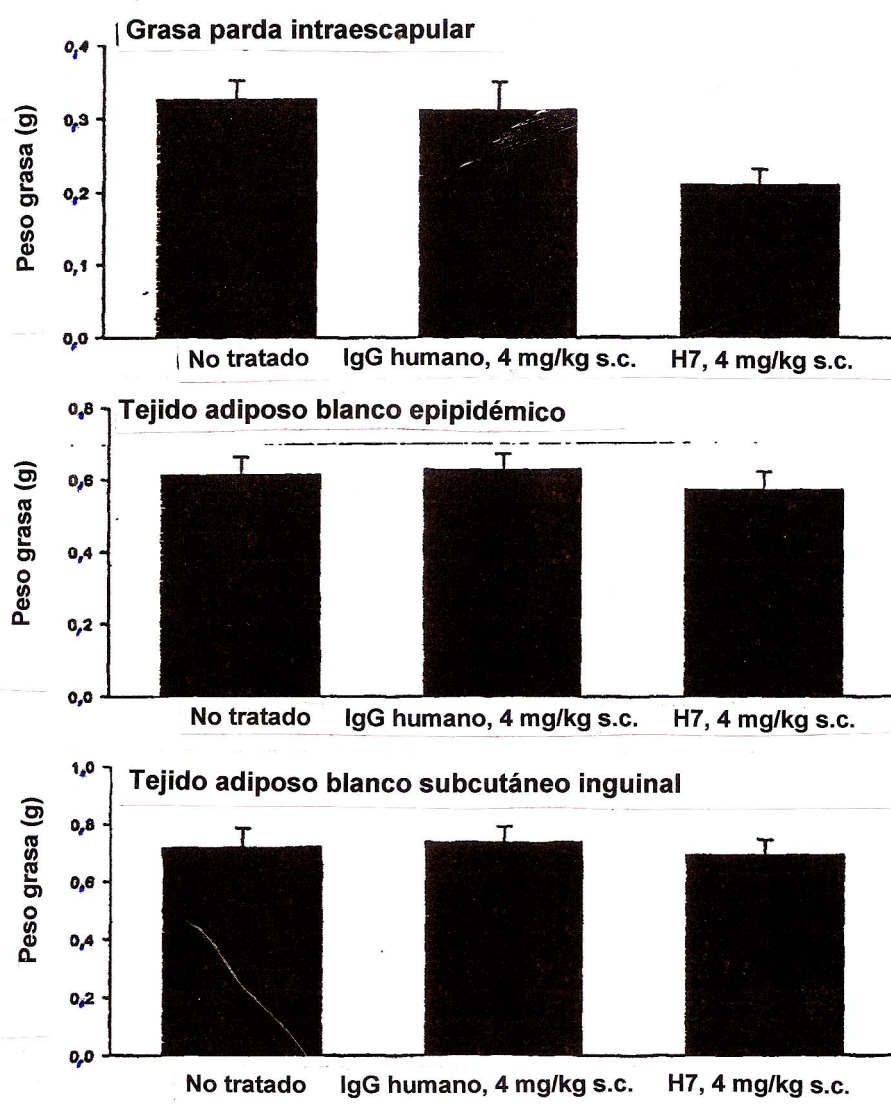


Fig. 20

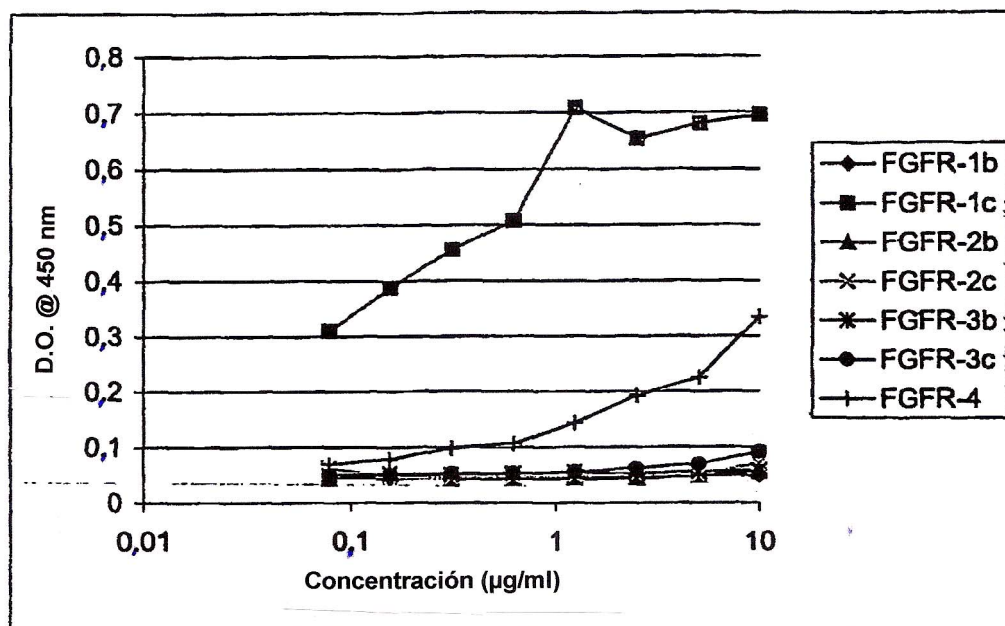


Fig. 21

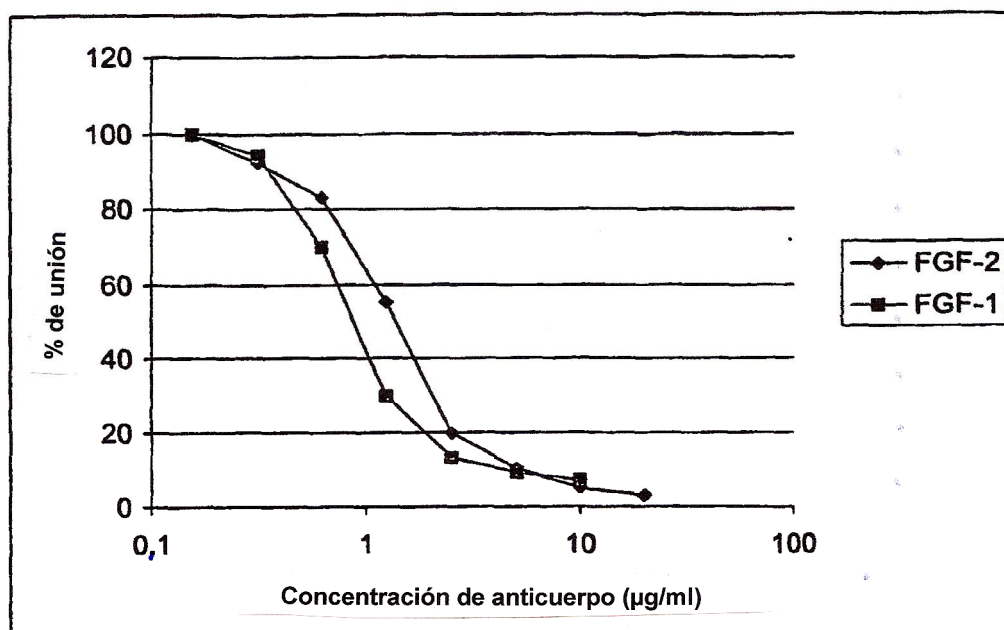


Fig. 22

FGF-2
(ng/ml)

50

50

-

-

FR1-A1
(μ g/ml)

-

10

10

-

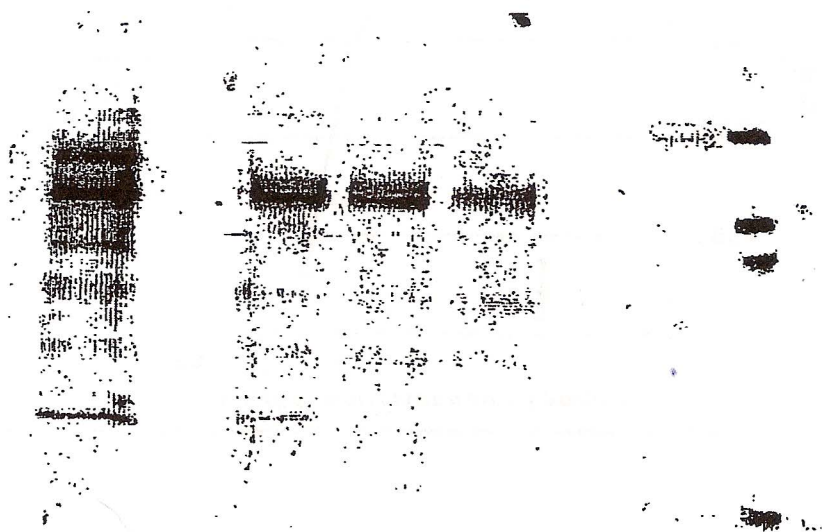


Fig. 23

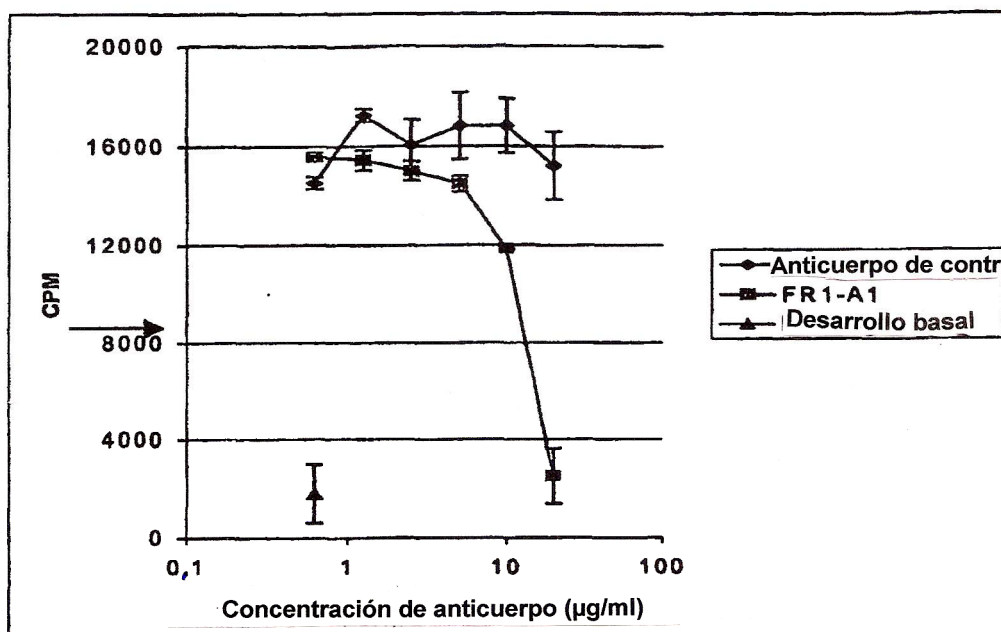


Fig. 24

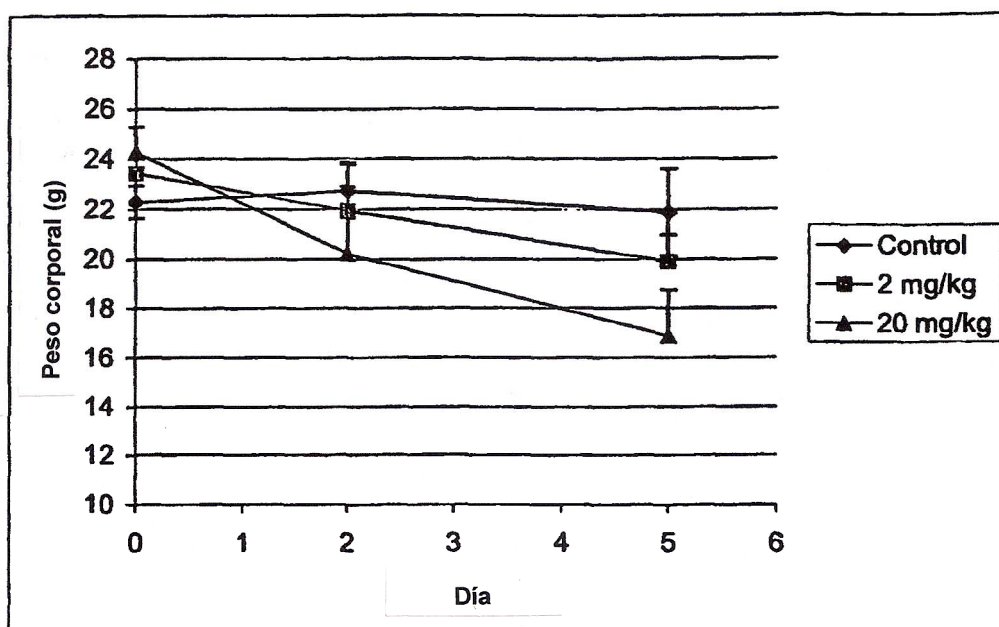


Fig .25

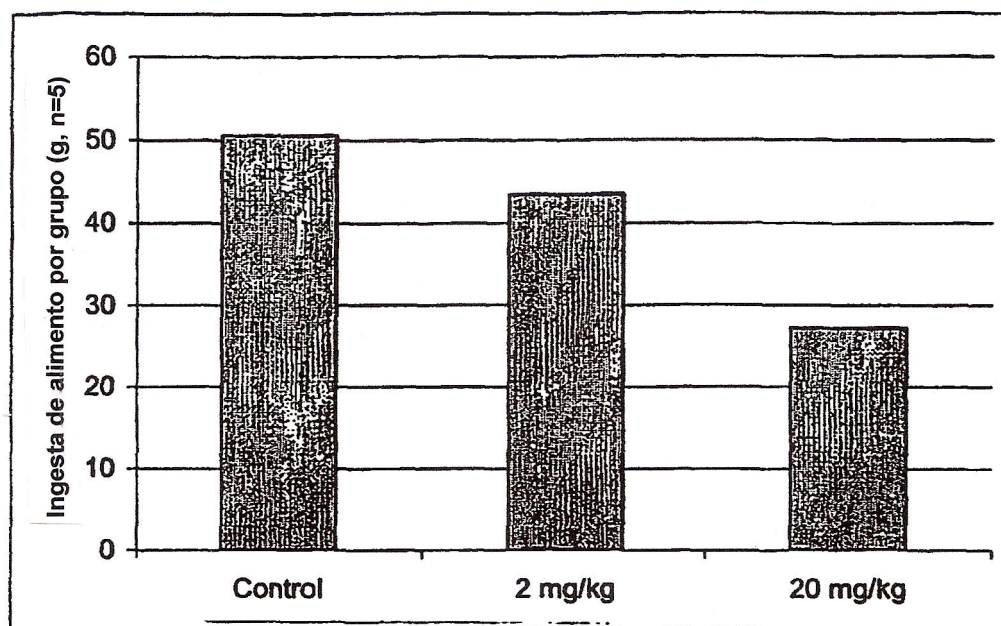


Fig. 26A.

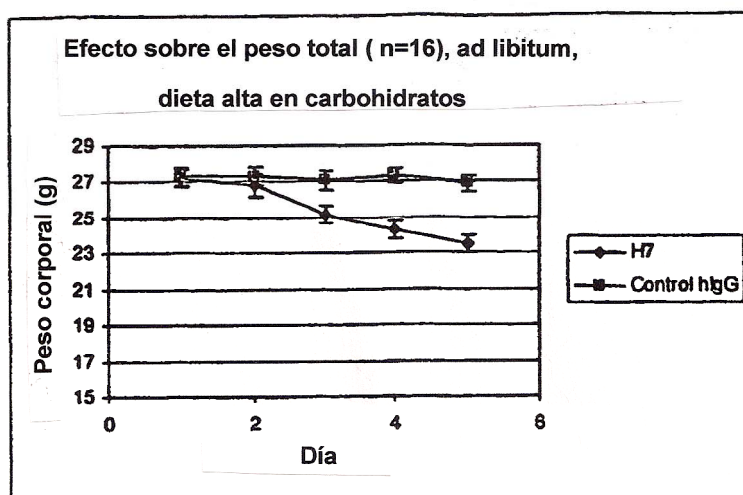


Fig. 26B.

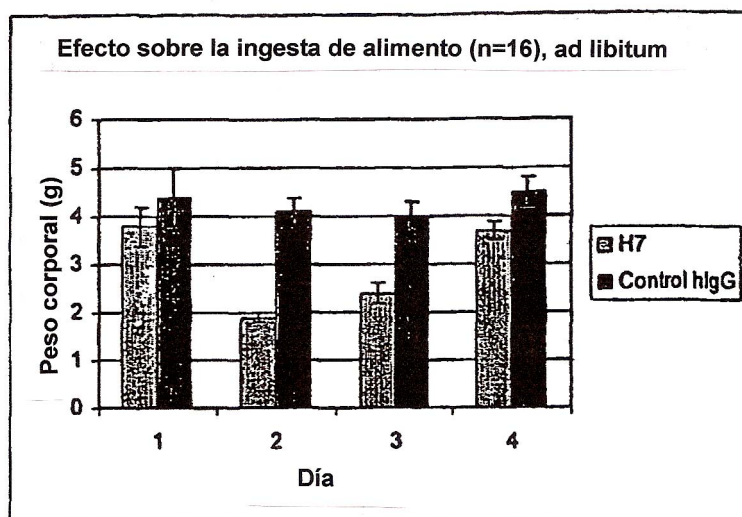


Fig. 26C

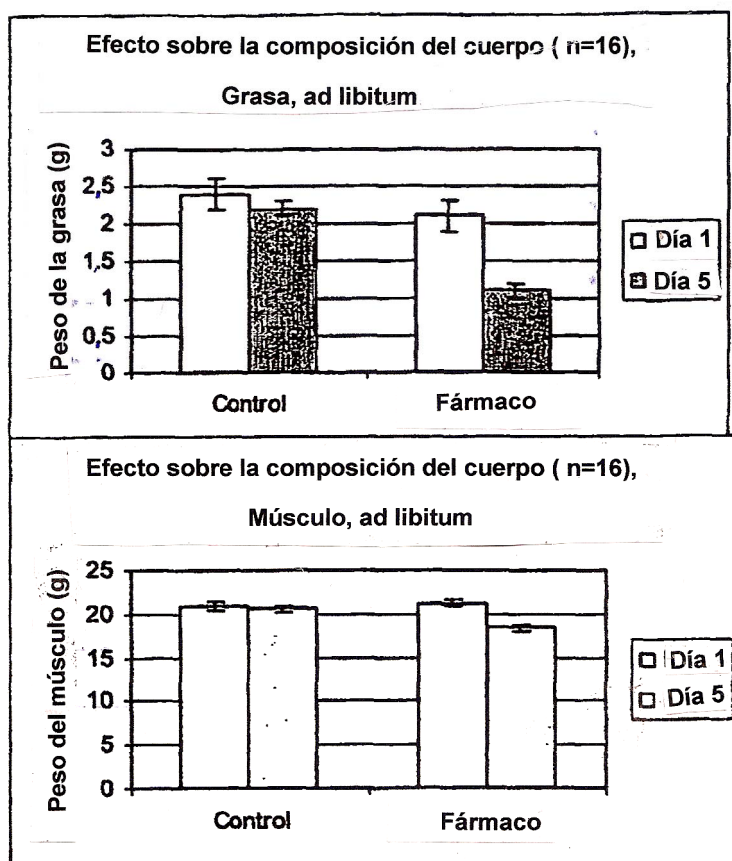


Fig. 26D

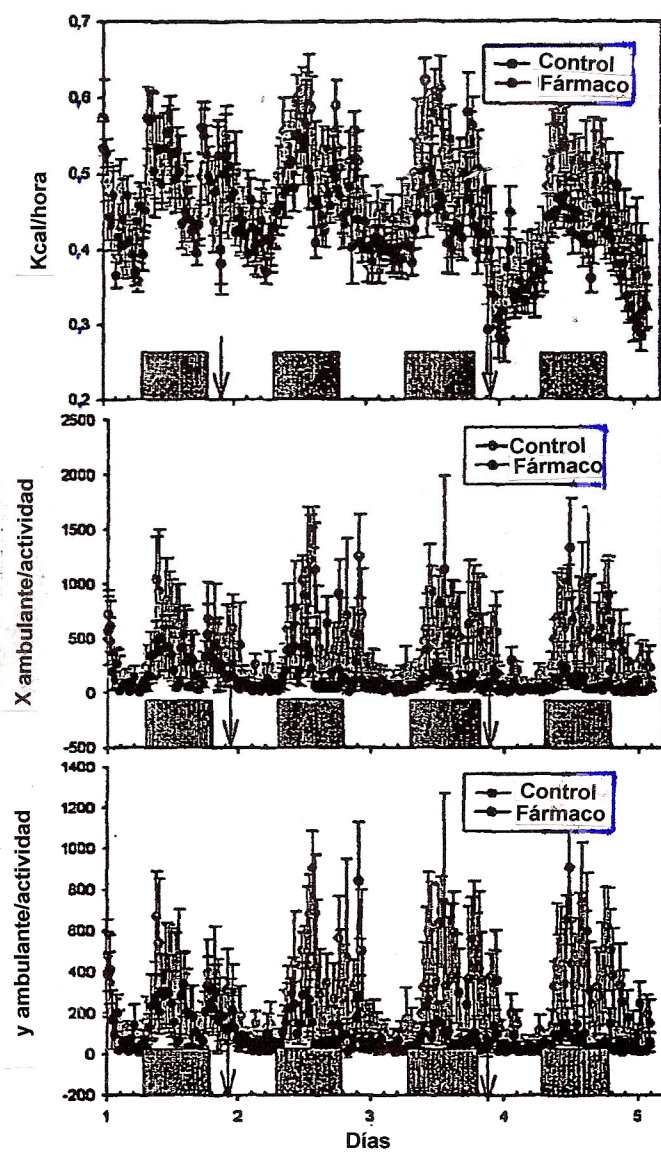


Fig. 26E

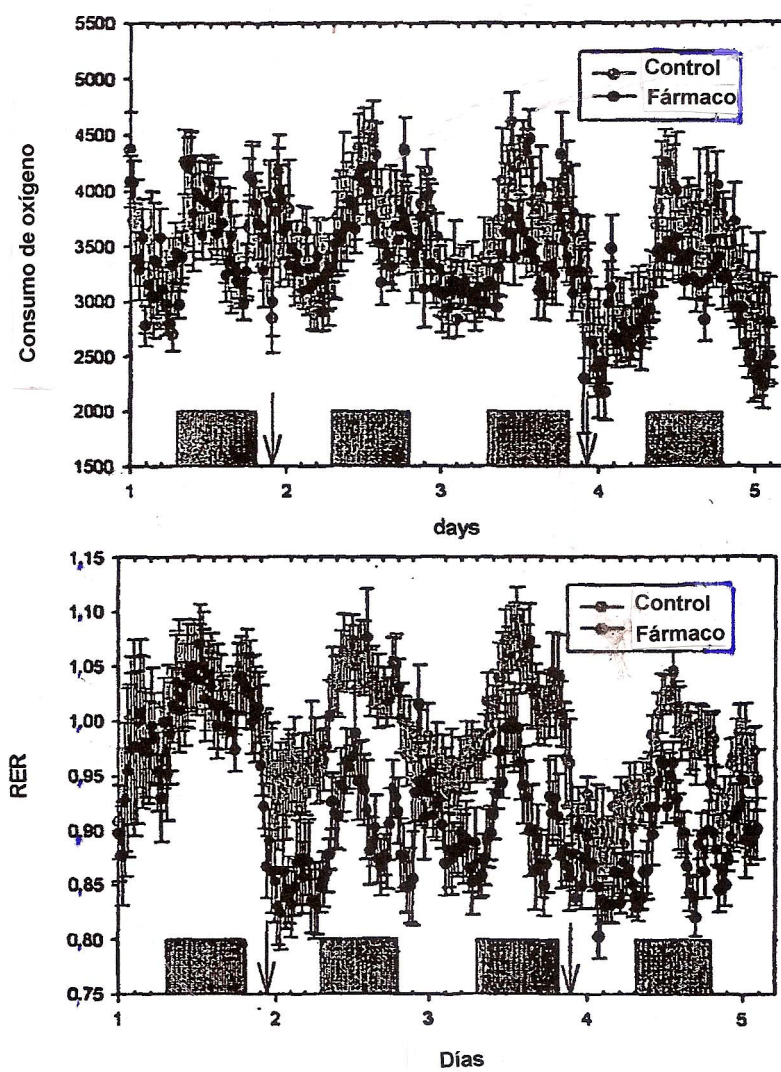


Fig. 27A

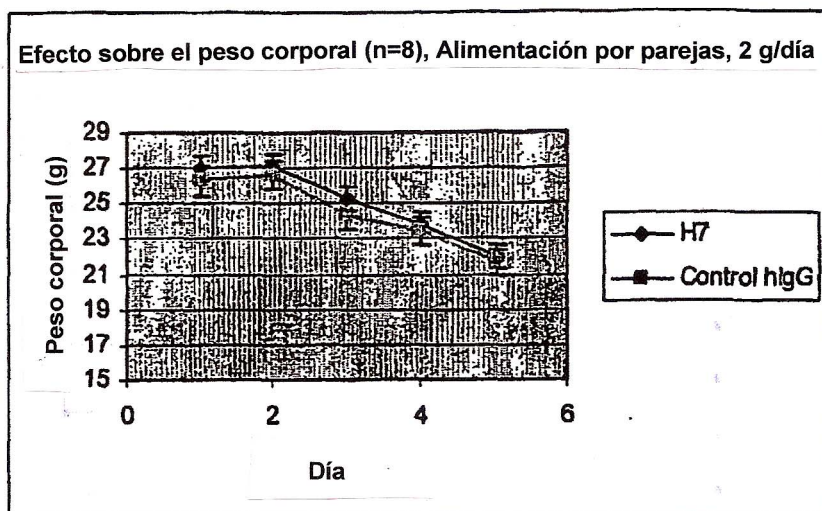


Fig. 27B

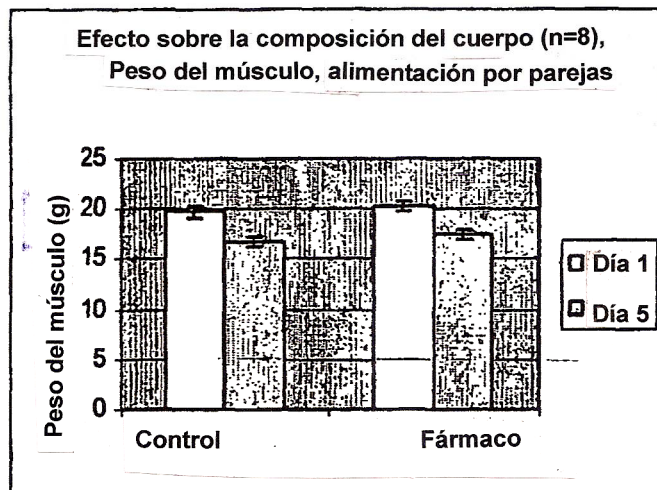
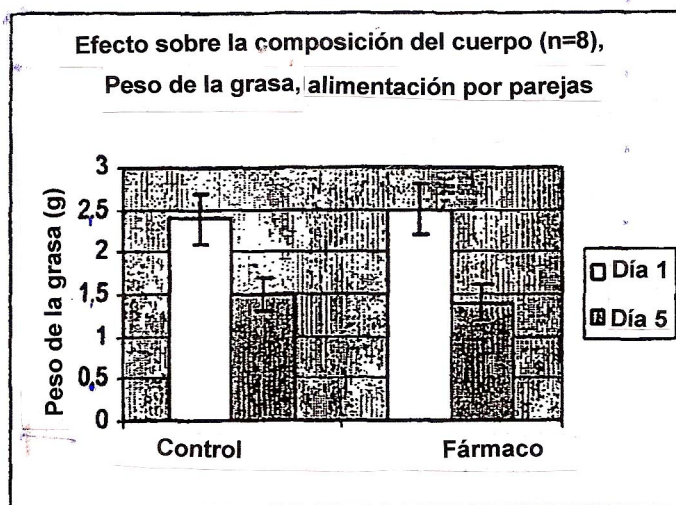


Fig. 27C

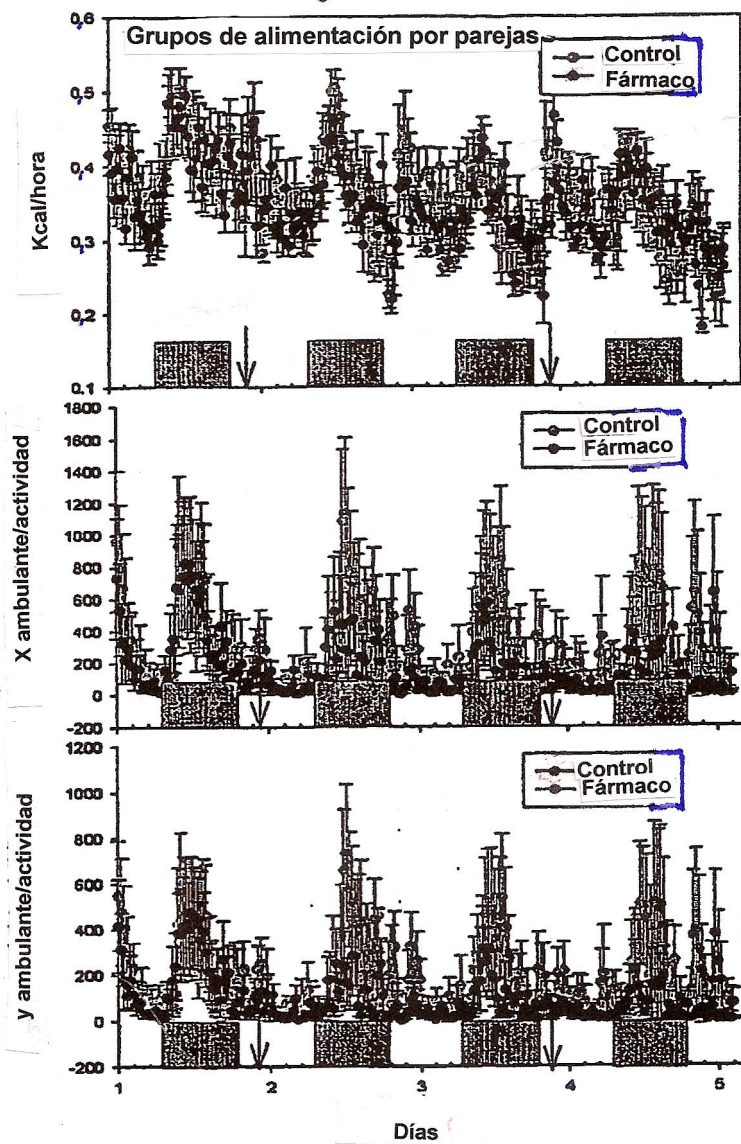


Fig. 27D

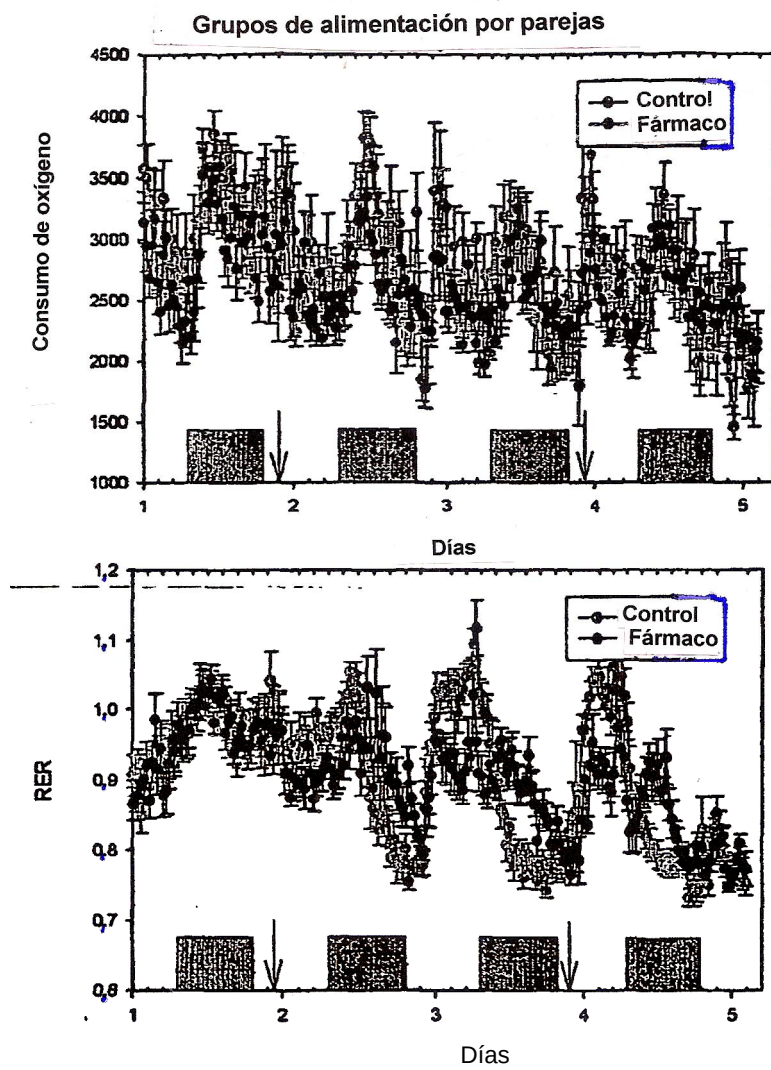


Fig. 28A. Secuencias variables del anticuerpo FR1-4H

Secuencia de la región variable de la cadena pesada (ADNc)

(cadena pesada gamma)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTTTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC	50
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACT	100
GGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTAT	150
ATCTATTACAGTGGGAGCACCACCACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGT	200
CGCCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT	250
CTGTGACCGCCCGGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGATTAC	300
TATGATAGTAGTGGTTATTACTTTTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGG	350
GACCACGGTCACCGTCTCAAGC	372

Secuencia de la región variable de la cadena pesada (aminoácido)

QVQLVEFGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGY	50
IYYSGSTNYPNPSLKSRVAISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREYY	100
YDSSGYIFYAFDIWGQGTITVTVSS	124

Secuencia de la región variable de la cadena ligera (ADNc)

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAG	50
GGTCTCCATCTCTTGTCTTGGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATG	100
TATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTTT	150
AGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAA	200
GTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG	250
AGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTG	300
TTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT	333

Secuencia de la región variable de la cadena ligera (aminoácido)

(cadena ligera lambda)

LPVLTQPPSASGTPGQRVSISSGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPKLLIF	50
RNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWV	100
FGGGTKLTVLG	111

Fig. 28B. CDRs de secuencias variables del anticuerpo FR1-4H

CDR de secuencias de aminoácido

V_H:

CDR1	SYAWS
CDR2	YIIYSGSTNYPNPSLKS
CDR3	EYYDSSGYFYAFDI

V_L:

CDR1	SGSSSNIGSNYVY
CDR2	RNNQRPS
CDR3	AAWDDSLSGWV

CDR de secuencias de ácido nucleico

V_H:

CDR1	AGTTACTACTGGAGC
CDR2	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCCTCAAGAGT
CDR3	GAGTATTACTATGATAGTAGTGGTTATTACTTTTATGCTTTTGATATC

V_L:

CDR1	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
CDR2	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
CDR3	GCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTG

Fig. 29

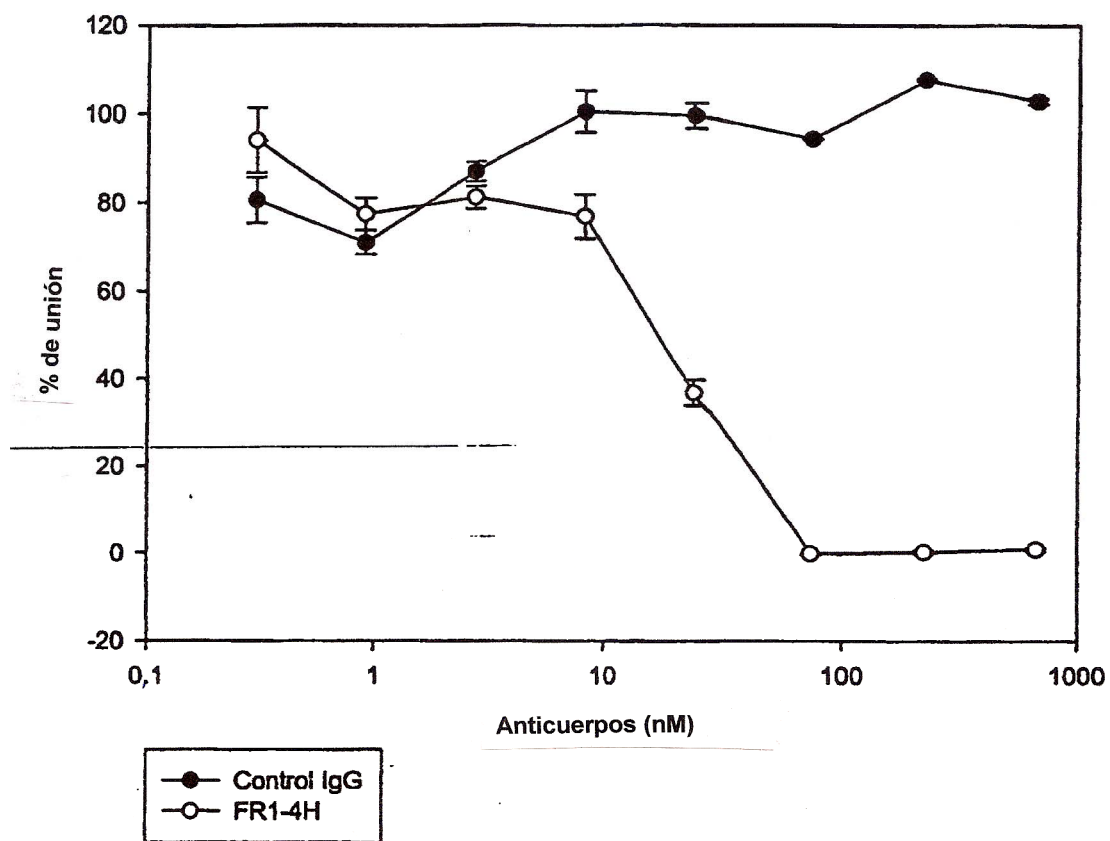
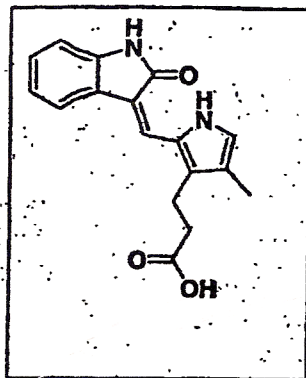
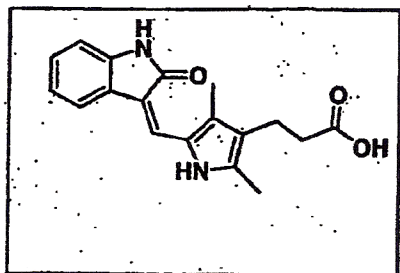
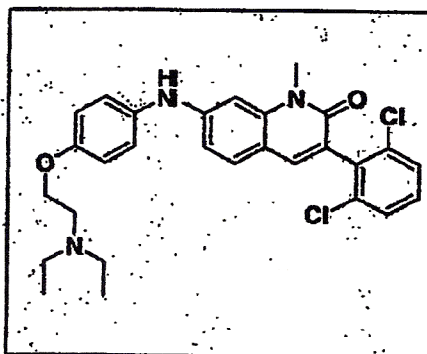
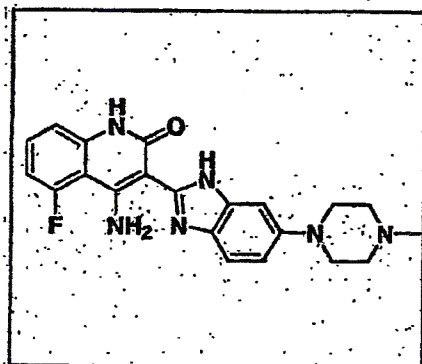


Fig. 30. Ejemplos de inhibidores de molécula pequeña de FGFR

Derivados indolinona:



Derivados quinolinona:



Derivados pirimido-piridina:

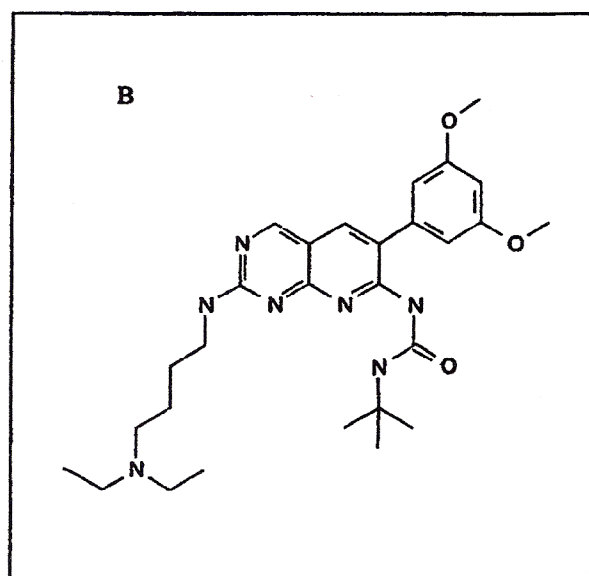
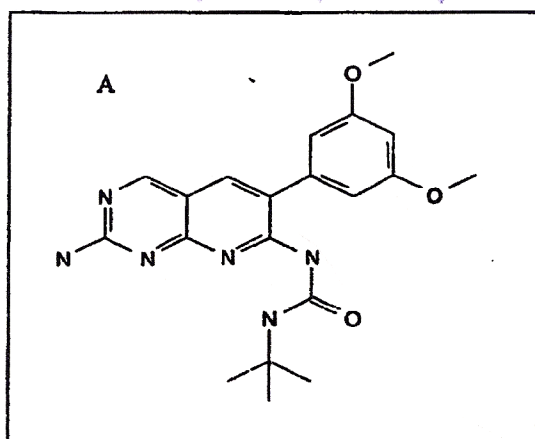
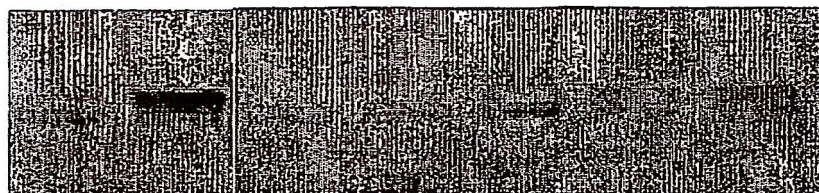


Fig. 31.

FGF	-	5 ng	5 ng	5 ng	5 ng	5 ng	5 ng
Derivado A pirimido-piridinas	-	-	0,5 μ M	0,2 μ M	0,1 μ M	0,05 μ M	0,02 μ M



FGF	-	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
Derivado B pirimido-piridinas	-	-	0,1 μ M	0,03 μ M	0,01 μ M

