

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 297**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2009** **PCT/US2009/045519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009** **WO09148928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009** **E 09759089 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 2288717**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales al factor básico de crecimiento de fibroblastos**

30 Prioridad:

29.05.2008 US 57183 P

17.04.2009 US 170561 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.09.2017

73 Titular/es:

GALAXY BIOTECH, LLC (100.0%)
22830 San Juan Road
Cupertino, CA 95014, US

72 Inventor/es:

KIM, KYUNG, JIN;
WANG, LIHONG;
PARK, HANGIL y
VASQUEZ, MAXIMILIANO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 633 297 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).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales al factor básico de crecimiento de fibroblastos

El trabajo descrito en esta solicitud fue financiado en parte por la subvención 5R44 CA101283-03 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la combinación de tecnologías de anticuerpos monoclonales (mAb) y ADN recombinante para el desarrollo de nuevos productos biológicos, y más particularmente, por ejemplo, a la producción de anticuerpos monoclonales que se unen y neutralizan el Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico.

Antecedentes de la invención

- 10 Los factores prototípicos de crecimiento de fibroblastos (FGF), FGF ácido (también llamado FGF1) y FGF básico (también llamado FGF2) se aislaron por primera vez en los años 70 (FGF2 de Gospodarowicz et al., J. Biol. Chem. 250: 2515, 1975). En la actualidad hay 22 miembros conocidos de la familia FGF, los cuales pueden agruparse en 7 subfamilias basándose en su similitud en las actividades y secuencias (Ornitz et al., Genome Biol. 2: 3005.1, 2001). Sin embargo, los miembros de la familia de FGF se unen a sólo cuatro receptores de tirosina quinasa (FGFR14) y sus isoformas, que se expresan de una manera específica de tejido. El subgrupo FGF1 consiste en FGF1 y FGF2, que se unen a los cuatro FGFRs, uniéndose especialmente fuertemente FGF2 a FGFR1c (Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271: 15292, 1996).

- 20 El FGF2 humano es un polipéptido no glicosilado de 18 kDa que consiste en 146 aminoácidos en la forma madura derivada de un precursor de 155 aa (Ornitz et al., Genome Biol. 2: 3005.1, 2001; Okada - Ban y col., Int. J. Biochem. Cell. Biol. 32: 263, 2000). Esta forma de 18 kDa de FGF2 no codifica una secuencia señal, pero puede ser secretada por una vía dependiente de la energía no convencional independiente del complejo ER-Golgi (Mignatti et al., J. Cell Physiol. 151: 81, 1992; Florkiewicz et al., J. Cell Physiol. 162: 388, 1995). La única copia del gen FGF2 codifica también cuatro formas de peso molecular elevado (HMW) de la proteína, además de la forma de 18 kDa, utilizando cuatro sitios de iniciación CUG alternativos que proporcionan extensiones N-terminales de diversos tamaños, dando como resultado proteínas de 22 kDa (196 aa), 22,5 kDa (201 aa), 24 kDa (210 aa) y 34 kDa (288 aa) (Florkiewicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3978, 1989; Prats et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1836, 1989). Las formas de HMW no son segregadas sino que son transportadas al núcleo de la célula donde pueden regular el crecimiento o comportamiento celular de una manera intracrina (Delrieu, FEBS Lett. 468: 6, 2000).

- 30 Además de unirse a FGFR1-4 con alta afinidad, FGF2 se une a proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG) con menor afinidad. Aunque el FGF2 se secreta como monómero, la superficie celular HSPG dimeriza FGF2 en una configuración no covalente de lado a lado que es posteriormente capaz de dimerizar y activar receptores de FGF (Mohammadi et al., Cytokine Growth Factor Rev 16: 107, 2005). La unión de FGF y HSPG al dominio extracelular de FGFR induce la dimerización, activación y autofosforilación del receptor.

- 35 Los FGF, y en particular FGF2, tienen un amplio espectro de actividades sobre diversos tipos de células (Ornitz et al., Genome Biol. 2: 3005.1, 2001). FGF2 estimula la proliferación de (es decir, es mitogénico para) ciertas células incluyendo fibroblastos y células endoteliales y es un factor de supervivencia (anti-apoptótico) para ciertas células tales como las células neurales (Okada-Ban, op. cit.). También estimula la diferenciación (morfogénesis) y la migración (motilidad) de las células endoteliales (Dow et al., Urology 55: 800, 2000). FGF2 participa en el desarrollo, especialmente del sistema nervioso. Es importante destacar que el FGF2 es un potente factor angiogénico (Presta et al., Cytokine and Growth Factor Rev. 16: 159, 2005).

- 45 Se cree que FGF2 y otros FGF juegan un papel en el cáncer, tanto estimulando la angiogénesis como las células tumorales directamente (Presta et al., op. cit.). Durante la progresión del tumor, las células cancerosas pueden responder al FGF2 extracelular secretado de las células del estroma (paracrino), y entonces las propias células tumorales pueden secretar FGF2 y responder a ella de una manera autocrina. Se ha demostrado que FGF2 o su receptor FGFR1 se expresan o sobreexpresan en la mayoría de los gliomas (Takahashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5710, 1990; Morrison et al. Cancer Res. 54: 2794, 1994). El FGF2 está implicado en la progresión de tumores de próstata (Dow et al., Urology 55: 800, 2000) y es un mediador clave de la proliferación de melanomas malignos (Wang et al., Nature Med. 3: 887, 1997). También se ha informado sobre la expresión y/o la participación de FGF2 o FGFR1 en la progresión tumoral para tumores de glándulas salivales (Myoken y col., J. Path. 178: 429, 1996), cáncer de esófago (Barclay et al., Clin. Cancer Res. 11: 7683, 2005), y carcinomas tiroideos (Boelaert et al., J. Clin. Endocrin. Metabol. 88: 2341, 2003).

- 55 Se ha informado que anticuerpos policlonales (antisuero) contra FGF2 inhiben el crecimiento tumoral de un condrosarcoma transplantable en ratones (Baird et al., J. Cell Biochem., 30:79, 1986), neutralizan diversas actividades de FGF2 in vitro (Kurokawa et al., J. Biol. Chem. 264: 7686, 1989), e inhiben el crecimiento de xenoinjertos intracraneales de células de glioma U87 cuando se aplican localmente (Stan et al., J. Neurosurg. 82: 1044, 1995). Entre los anticuerpos monoclonales, se ha informado que el mAb DG2 neutraliza las actividades de FGF2 in vitro e in vivo (Reilly et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 164: 736, 1989; documento WO 91/06668),

- inhiben modestamente el crecimiento de xenoinjertos de glioma C6 de rata en ratones desnudos (Gross et al., J. Nat. Cancer Inst. 85: 121, 1993), e inhiben modestamente el crecimiento de condrosarcomas de rata cuando se administran intralesionalmente pero no i.p. o i.v. (Coppola et al., Anticancer Res. 17: 2033, 1997). De forma similar, se ha informado que el mAb anti-FGF2 DE6 inhibe el crecimiento de células de glioma in vitro (Morrison et al., J. Neuroscience Res. 34: 502, 1993). Por otra parte, se informó que los mAb anti-FGF2 bFM-1 y bFM-2 inhibían el crecimiento de células endoteliales in vitro pero no bloqueaban la angiogénesis tumoral in vivo (Matsuzaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9911, 1989). Se ha informado que el mAb 1E6 anti-FGF2 neutralizante inhibe el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon de RPMI4788 (Aonuma et al., 19: 4039, 1999). Se ha informado que el mAb anti-FGF2 254F1 inhibe la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), mientras que se ha informado que el mAb FB-8 inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas in vitro (Kuhn et al. Lung Cancer 44: 167, 2004). Se informó que el mAb 3H3 anti-FGF2 suprimía el crecimiento de los genotipos U87MG y T98G y los xenoinjertos de células HeLa (Takahashi et al., FEBS Let. 288: 65, 1991) y el crecimiento de la línea celular 3T3 transfectada con FGF2 K1000 en ratones (Hori et al., Cancer Res. 51: 6180, 1991). Ogasawara et al. (Hepatology, 24 (1): pp 198-205, 1996) describe también el anticuerpo 3H3.
- El mAb anti-FGF2 de GAL-F2 descrito en el presente documento se discutió en la reunión anual AACR 2009 en el póster N° 1236.

Breve resumen de la invención

- El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une y neutraliza el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (FGF2), en el que el mAb es quimérico, humanizado o humano y compite por su unión a FGF2 y se une al mismo epítipo, con un anticuerpo producido por el hibridoma PTA-8864, y en el que el mAb inhibe el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón. Como se describe a continuación, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal GAL-F2, cuyo número ATCC es PTA-8864, se ha depositado en la American Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, el 8 de enero de 2008 bajo el Tratado de Budapest.
- En el presente documento se describe un mAb neutralizador para el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (FGF2), en el que el mAb inhibe al menos una, y preferiblemente varias o todas las actividades biológicas de FGF2, incluyendo la unión a uno o más de los cuatro receptores de FGF FGFR1-4; induciendo la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de pulmón de visón Mv 1 Lu, y/o diversas células tumorales humanas; e induciendo la angiogénesis. El mAb anti-FGF2 puede inhibir tal actividad cuando se usa como un solo agente. Preferiblemente, el mAb descrito en la presente invención está modificado genéticamente, p. ej. es quimérico, humanizado o humano.

Los anticuerpos ejemplares de acuerdo con la invención son las formas quiméricas y humanizadas de GAL-F2 y los mAbs que tienen el mismo epítipo o que compiten por la unión con GAL-F2.

La invención también proporciona líneas celulares que producen anticuerpos de acuerdo con la invención.

- La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo neutralizante anti-FGF2 de acuerdo con la invención, por ejemplo GAL-F2 quimérico o humanizado. En una realización, la composición farmacéutica es para uso en la administración a un paciente y para uso en el tratamiento del cáncer u otra enfermedad en el paciente.

Breve descripción de los dibujos

- Fig. 1. ELISA de unión de GAL-F2 y mAb de ratón de control (mIgG) a FGF2 humano (hFGF2) y FGF29 de ratón (mFGF2).
- Fig. 2. ELISA de unión de FGFR-Fc/FGF2-Flag mostrando la inhibición por GAL-F2 pero no por el mAb 5G8 de ratón de control para cada uno de los cuatro receptores FGFR1-4 de FGF.
- Fig. 3. Ensayo de unión competitiva de GAL F2 biotinilada a FGF2 humano con diversos mAbs anti-FGF2.
- Fig. 4. Inhibición de la proliferación inducida por FGF2 de células BaF3 transfectadas de forma estable con FGFR1 o FGFR2, mediante GAL-F2 o mAb 5G8 de control. Ninguno significa que no se aplicó FGF2 (o mAb) a las células.
- Fig. 5. Inhibición de la proliferación inducida por FGF2 de células epiteliales de pulmón de visón Mv1 Lu por GAL-F2 o mAb 5G8 de control. Ninguno significa que no se aplicó FGF2 (o mAb) a las células.
- Fig. 6. Fotomicrografías de células SMCC-7721 clonadas en agar blando en presencia de mAb de ratón de control (mIgG), mAb anti-FGF2 de GAL-F2 o bFM-1.
- Fig. 7. Crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon humano RPMI 4788 en ratones tratados con GAL-F2 (100 μ g dos veces por semana) o PBS solo a partir de 5 días después de la inoculación del tumor.
- Fig. 8. Crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon humano RPMI 4788 en ratones tratados con mAb anti-FGF2

de GAL-F2 o bFM-1 (100 μ g dos veces por semana) o PBS solo, a partir de 6 días después de la inoculación del tumor.

Fig. 9. Crecimiento de xenoinjertos de tumores de hepatoma humano SMMC-7721 en ratones tratados con PBS solo, GAL-F2 (100 μ g dos veces por semana), cisplatino (100 μ g una vez por semana) o GAL - F2 y cisplatino. 5 ratones por grupo.

Fig. 10. Crecimiento de xenoinjertos tumorales de hepatoma humano HepG2 en ratones tratados con PBS solo, mAb de GAL-F2 o M225 anti-EGFR (100 μ g dos veces por semana), o ambos GAL-F2 y M225, comenzando a los 6 días después de la inoculación. 6 ratones por grupo.

Figs. 11A y 11B. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones variables maduras de la cadena ligera (A) de HuGAL-F2 (SEQ ID NO: 2) y de la cadena pesada (B) (SEQ ID NO: 5) alineadas con GAL-F2 de ratón (SEQ ID NOS: 1 y 4) y las regiones V aceptoras humanas (SEQ ID NOS: 3 y 6). Las CDR están subrayadas en las secuencias GAL-F2, y los aminoácidos sustituidos con aminoácidos L2G7 de ratón están subrayados dos veces en las secuencias HuGAL-F2. El código de aminoácidos de 1 letra y el sistema de numeración Kabat se utilizan tanto para la cadena ligera como para la cadena pesada.

Fig. 12. Unión competitiva de mAbs humanizados (HuGAL-F2) y quiméricos (ChGAL-F2) y anticuerpo humano de control hlgG, llevados a cabo como se describe en la memoria descriptiva.

Fig. 13. Secuencias de aminoácidos de toda la cadena ligera del anticuerpo HuGAL-F2 maduro (A) (SEQ ID NO: 7) y la cadena pesada (B) (SEQ ID NO: 8). El primer aminoácido en cada línea está numerado; la numeración es secuencial. En la cadena ligera, se subraya el primer aminoácido de la región C_k, y en la cadena pesada se subrayan los primeros aminoácidos de las regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-FGF2 (como se define en las reivindicaciones de la presente memoria, en particular, en la reivindicación 1, o como se define para la invención en la sección "Breve resumen de la invención" anteriormente); una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo monoclonal neutralizante anti-FGF2; y un tal anticuerpo monoclonal neutralizante anti-FGF2, o una composición farmacéutica que lo comprende, para su uso en el tratamiento de la enfermedad.

1. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas complejas muy grandes (peso molecular de aprox. 150.000 o aproximadamente 1320 aminoácidos) con estructura interna intrincada. Una molécula de anticuerpo natural contiene dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. Cada cadena ligera y cadena pesada a su vez consiste en dos regiones: una región variable ("V") implicada en la unión del antígeno diana, y una región constante ("C") que interactúa con otros componentes del sistema inmune. Las regiones variables de cadena ligera y pesada se unen en un espacio tridimensional para formar una región variable que se une al antígeno (por ejemplo, un receptor en la superficie de una célula). Dentro de cada región variable de cadena ligera o pesada, hay tres segmentos cortos (promediando 10 aminoácidos de longitud) denominadas las regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las seis CDR en un dominio variable de anticuerpo (tres de la cadena ligera y tres de la cadena pesada) se pliegan juntas en un espacio tridimensional para formar el sitio de unión de anticuerpo real que se bloquea sobre el antígeno diana. La posición y longitud de las CDR han sido definidas con precisión por Kabat, E. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1983, 1987. La parte de una región variable no contenida en las CDR se denomina marco, que forma el entorno para las CDR. Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901, 1987, han definido el concepto relacionado de regiones hipervariables o bucles determinados por la estructura.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el que se injertan las CDR de un anticuerpo de ratón ("anticuerpo donante", que también puede ser de rata, hámster u otras especies no humanas) sobre un anticuerpo humano ("anticuerpo aceptor"). La secuencia del anticuerpo aceptor puede ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano madura, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpo humano o una secuencia de línea germinal. De este modo, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene CDRs de un anticuerpo donante y un marco de región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano. Además, para retener una alta afinidad de unión, se puede emplear al menos uno de dos elementos estructurales adicionales. Véase la Patente de EE.UU. 5.530.101 y 5.585.089, que proporcionan instrucciones detalladas para la construcción de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo humanizado tiene típicamente una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. En general, ni la estructura de la región variable de la cadena pesada de una cadena pesada humanizada ni la estructura de la región variable de la cadena ligera de una cadena ligera humanizada incluye más de diez o doce sustituciones dando como resultado residuos no presentes en el marco de la región variable de cadena pesada o ligera aceptora humana (incluyendo marcos de regiones variables de consenso humanas y marcos de regiones variables humanas compuestas).

Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR intactas (como se define por Kabat) de un

anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos de las CDR completas de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis et al., J. Immunol. 169: 3076, 2002). Numerosos anticuerpos se han descrito en la literatura científica en los que se puede prescindir de una o dos CDR para la unión. Padlan et al., FASEB Journal 9: 133 - 139 (1995); Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415 - 428 (2002); Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36: 1079 - 1091, (1999); Tamura y col., Journal of Immunology, 164: 1432 - 1441 (2000). De forma similar, puede ser necesario incorporar sólo una parte de las CDR, es decir, el subconjunto de residuos CDR requeridos para la unión, denominados SDR, en el anticuerpo humanizado.

Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y no en los SDR pueden ser identificados en base a estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDRH2 no son a menudo requeridos), de regiones de CDR de Kabat situadas fuera de los bucles hipervariables de Chothia, mediante modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales et al., Mol. Immunol. 41:863, 2004. Si se omite una CDR o un residuo de los mismos, suele estar sustituido con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la secuencia aceptora humana que suministra las secuencias del marco de la región variable. El número de tales sustituciones a incluir refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Tales sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, por consiguiente, disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Posiciones para la sustitución dentro de las CDR y aminoácidos para sustituir también se pueden seleccionar empíricamente.

En el primer elemento estructural mencionado anteriormente para retener una alta afinidad de unión en un anticuerpo humanizado, el marco de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado se elige para tener una identidad de secuencia máxima (entre 65% y 95%) con el marco de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo donante, seleccionando adecuadamente el anticuerpo aceptor entre los muchos anticuerpos humanos conocidos. En el segundo elemento estructural, al construir el anticuerpo humanizado, los aminoácidos seleccionados en el marco del anticuerpo aceptor humano (fuera de las CDR) se reemplazan con los correspondientes aminoácidos del anticuerpo donante, de acuerdo con reglas especificadas. Específicamente, los aminoácidos a reemplazar en el marco se eligen en base a su capacidad para interactuar con las CDR. Por ejemplo, los aminoácidos sustituidos pueden ser adyacentes a una CDR en la secuencia del anticuerpo donante o dentro de 4-6 angstroms de una CDR en el anticuerpo humanizado, medido en el espacio tridimensional.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que la región variable de un anticuerpo de ratón (u otro roedor) se combina con la región constante de un anticuerpo humano; su construcción mediante ingeniería genética es bien conocida. Tales anticuerpos conservan la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, mientras que son aproximadamente dos tercios de humanos. La proporción de secuencia no humana presente en anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados sugiere que la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos es intermedia entre los anticuerpos de ratón y humanizados. Otros tipos de anticuerpos modificados genéticamente que pueden tener una inmunogenicidad reducida con respecto a los anticuerpos de ratón incluyen los anticuerpos humanos fabricados usando métodos de presentación en fagos (Dower et al., documento WO 91/17271, McCafferty et al., documento WO92/001047, Winter, documento WO92/20791 y Winter, FEBS Lett., 23: 92, 1998) o utilizando animales transgénicos (Lonberg et al., documento WO93/12227; Kuchlerlapati, documento WO91/10741).

Como se usa en la presente memoria, la expresión anticuerpo "de tipo humano" se refiere a un mAb en el que una porción sustancial de la secuencia de aminoácidos de una o ambas cadenas (por ejemplo, aproximadamente 50% o más) se origina a partir de genes de inmunoglobulina humana. Por lo tanto, los anticuerpos de tipo humano abarcan pero no se limitan a anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos. Como se usa en este documento, se espera que un mAb con "inmunogenicidad reducida" tenga inmunogenicidad significativamente menor que un anticuerpo de ratón cuando se administra a pacientes humanos. Tales anticuerpos abarcan mAbs quiméricos, humanizados y humanos, así como mAb fabricados reemplazando aminoácidos específicos en anticuerpos de ratón que pueden contribuir a epítopos de células B o T, por ejemplo, residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991). Como se usa en la presente memoria, un mAb "genéticamente modificado" es uno para el cual los genes se han construido o puesto en un entorno no natural (por ejemplo, genes humanos en un ratón o en un bacteriófago) con la ayuda de técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, no abarcan un mAb de ratón fabricado con tecnología de hibridoma convencional.

El epítipo de un mAb es la región de su antígeno a la que se une el mAb. Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o superponiéndose si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso de $1 \times$, $5 \times$, $10 \times$, $20 \times$ o $100 \times$ de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o incluso 99%, como se mide en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si se unen a la misma región del antígeno o si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

2. Anticuerpos anti-FGF2 neutralizantes

Se dice que un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une a FGF2 (es decir, un mAb anti-FGF2) neutraliza a FGF2 o es neutralizante, si la unión inhibe parcial o totalmente una o más actividades biológicas de FGF2 (es decir, cuando se usa el mAb como agente único). Entre las propiedades biológicas de FGF2 que un anticuerpo neutralizante puede inhibir están la capacidad de FGF2 de unirse a uno o más de los cuatro receptores FGF, para estimular la proliferación de (es decir, ser mitogénicas para) ciertas células incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de pulmón de visón Mv 1 Lu, y varias células tumorales humanas; para estimular la diferenciación y migración de células tales como células endoteliales, o para estimular la angiogénesis, por ejemplo como se mide por estimulación de la proliferación de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) o la formación de tubos o por inducción de vasos sanguíneos cuando se aplica a la membrana corioalantótica del embrión de pollo (CAM).

Un mAb neutralizante de la invención a una concentración de, por ejemplo, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ó 50 µg/ml inhibe una función biológica de FGF2 en aproximadamente al menos 50% pero preferiblemente 75%, más preferiblemente en un 90% o 95% o incluso en 99%, y lo más preferiblemente aproximadamente en 100% (esencialmente completamente) como se ensaya mediante los métodos descritos en los Ejemplos o conocidos en la técnica. Típicamente, el grado de inhibición se mide cuando la cantidad de FGF2 utilizada es suficiente para estimular completamente la actividad biológica, o es 1, 2 ó 5 ng/ml o 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 3 o 10 µg/ml. Preferiblemente, el mAb es neutralizante, es decir, inhibe la actividad biológica, cuando se usa como un solo agente, pero opcionalmente se pueden usar 2 mAb juntos para dar inhibición. Lo más preferiblemente, el mAb neutraliza no sólo una sino dos, tres o varias de las actividades biológicas enumeradas anteriormente; para los propósitos de la presente invención, un mAb anti-FGF2, que se usa como un solo agente neutraliza todas las actividades biológicas de FGF2, se llama "totalmente neutralizante", y tales mAb son los más preferibles. Los mAbs de la invención son preferiblemente específicos para FGF2, es decir que no se unen, o se unen sólo en un grado mucho menor (por ejemplo, al menos 10 veces menos), proteínas que están relacionadas con FGF2 tales como los otros FGF, por ejemplo, FGF1, y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Algunos mAbs de la invención se unen a FGF2 humano y FGF2 de ratón, o se unen a FGF2 humano y uno, dos o más o todos los FGF2 de ratón, rata, conejo, pollo, perro y/o mono (por ejemplo, el macaco cangrejero). Otros mAbs son específicos para FGF2 humano. Los mAbs de la invención tienen típicamente una afinidad de unión (K_a) para FGF2 de al menos 10^7 M^{-1} pero preferiblemente 10^{8-9} M^{-1} o superior, y lo más preferiblemente 10^9 M^{-1} o Mayor o incluso 10^{10} M^{-1} o superior.

Los mAbs de la invención incluyen anticuerpos anti-FGF2 en su forma tetramérica natural (2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas) y pueden ser de cualquiera de los isotipos conocidos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE y sus subtipos, es decir, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humana e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de ratón. También se pretende que los mAb de la invención incluyan fragmentos de anticuerpos tales como Fv, Fab y F(ab')₂; anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17: 105, 1987), anticuerpos de cadena sencilla (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879, 1988; Bird et al., Science 242: 423, 1988); anticuerpos de un solo brazo (Nguyen et al., Cancer Gene Ther. 10: 840, 2003); y anticuerpos con regiones constantes alteradas (por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 5.624.821). Los mAb descritos en este documento pueden ser de origen animal (por ejemplo, ratón, rata, hámster o pollo). Los mAb de la invención pueden ser modificados genéticamente. Los mAbs de roedor se preparan por métodos estándar bien conocidos en la técnica, que comprenden inmunización múltiple con FGF2 en el adyuvante ip apropiado, iv, o en la almohadilla de pie, seguido de extracción de células de bazo o de nódulos linfáticos y fusión con una línea celular inmortalizada adecuada y después selección para hibridomas que producen el anticuerpo que se une a FGF2, por ejemplo, véase en los Ejemplos. Los mAbs quiméricos y humanizados, fabricados por los métodos conocidos en la técnica mencionados anteriormente, son realizaciones preferidas de la invención. También se prefieren anticuerpos humanos producidos, por ejemplo, mediante métodos de presentación de fagos o ratones transgénicos (véase, por ejemplo, Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, supra).

El mAb anti-FGF2 neutralizante GAL-F2 descrito infra es un ejemplo descrito en este documento. Una vez que se ha aislado un solo mAb anti-FGF2 anti-humano arquetípico, por ejemplo GAL-F2, que tiene las propiedades deseadas descritas en este documento de FGF2 neutralizante, es fácil generar otros mAbs con propiedades similares, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse con FGF2 como se ha descrito anteriormente, producirse hibridomas, y los mAbs resultantes examinarse en cuanto a su capacidad para competir con el mAb arquetípico para su unión a FGF2. Los ratones también pueden inmunizarse con un fragmento más pequeño de FGF2 que contiene el epítipo al que se une GAL-F2. El epítipo puede localizarse, por ejemplo, seleccionando para la unión a una serie de péptidos superpuestos que abarcan FGF2. Alternativamente, se puede usar el método de Jaspers et al., Biotechnology 12: 899, 1994, para guiar la selección de mAbs que tienen el mismo epítipo y por lo tanto propiedades similares al mAb arquetípico, por ejemplo GAL-F2. Utilizando la presentación de fagos, primero se empareja la cadena pesada del anticuerpo arquetípico con un repertorio de cadenas ligeras (preferiblemente humanas) para seleccionar un mAb de unión a FGF2 y luego la nueva cadena ligera se empareja con un repertorio de cadenas pesadas (preferiblemente humanas) para seleccionar un mAb de unión a FGF2 (preferiblemente humano) que tiene el mismo epítipo que el mAb arquetípico. Alternativamente, pueden obtenerse variantes de GAL-F2 por mutagénesis de ADNc que codifica las cadenas pesada y ligera de GAL-F2 obtenidas a partir del hibridoma.

Los mAbs neutralizantes con el mismo epítipo o superpuesto como GAL-F2, por ejemplo, que compiten por la unión

a FGF2 con GAL-F2, proporcionan otros ejemplos. Una forma quimérica o humanizada de GAL-F2 es una realización especialmente preferida. Los mAbs que son 90%, 95% o 99% idénticos a GAL-F2 en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera y mantienen sus propiedades funcionales, y/o que difieren de ella por un pequeño número de sustituciones de aminoácidos irrelevantes funcionales (por ejemplo, sustituciones conservativas), deleciones o inserciones, están también incluidas en la invención o se describen en este documento. También se incluyen en la invención mAbs que tienen al menos una y preferiblemente todas las seis CDR (s) que son 90%, 95% o 99% o 100% idénticas a las CDRs correspondientes de GAL-F2. Aquí, como en otras partes de esta solicitud, se determinan las identidades de secuencias porcentuales con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo por la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si se compara una región de anticuerpo sujeto (por ejemplo, toda la región variable madura de una cadena pesada o ligera) con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo de sujeto y referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región de sujeto como en la región de anticuerpo de referencia dividida por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con huecos no contados, multiplicados por 100 para convertir en porcentaje.

Los mAbs nativos como se describen en este documento pueden producirse a partir de sus hibridomas. Los mAbs modificados genéticamente, por ejemplo mAbs quiméricos o humanizados, pueden expresarse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes que codifican sus regiones V de cadena ligera y pesada se pueden sintetizar a partir de oligonucleótidos solapantes e insertarse junto con regiones C disponibles en vectores de expresión (por ejemplo, disponibles comercialmente de Invitrogen) que proporcionan las regiones reguladoras necesarias, por ejemplo, promotores, potenciadores, sitios poli A, etc. Se prefiere el uso del promotor-potenciador de CMV. Los vectores de expresión pueden entonces ser transfectados usando diversos métodos bien conocidos tales como lipofección o electroporación en una variedad de líneas celulares de mamíferos tales como CHO o mielomas no productores incluyendo Sp2/0 y NS0 y células que expresan los anticuerpos seleccionados mediante la selección apropiada de antibióticos. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N° 5.530.101. Pueden producirse cantidades mayores de anticuerpo cultivando las células en biorreactores comercialmente disponibles.

Una vez expresados, los mAbs u otros anticuerpos de la invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica tales como microfiltración, ultrafiltración, cromatografía de afinidad de proteína A o G, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y/u otras formas de cromatografía de afinidad basadas en colorantes orgánicos o similares. Se prefieren anticuerpos sustancialmente puros de al menos aproximadamente 90 ó 95% de homogeneidad, y el 98% o 99% o más de homogeneidad es lo más preferido, para usos farmacéuticos.

3. mAb de la invención para su uso en métodos de tratamiento

La invención también proporciona un mAb de la invención (anti-FGF2) para uso en un método de tratamiento en el que el mAb se administra a pacientes que tienen una enfermedad (tratamiento terapéutico) o están en riesgo de ocurrencia o recurrencia de una enfermedad (tratamiento profiláctico). El término "paciente" incluye pacientes humanos; pacientes veterinarios, tales como gatos, perros y caballos; animales de granja, tales como ganado vacuno, ovejas y cerdos; y animales de laboratorio utilizados para fines de ensayo, tales como ratones y ratas. Los mAb, para su uso en el método de tratamiento, son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos. El mAb, para su uso en un método de tratamiento de pacientes humanos, se une a la proteína FGF2 humana, cuya secuencia está proporcionada, por ejemplo, por Ornitz et al., Genome Biol. 2:3005.1, 2001 o Okada-Ban y col., Int. J. Biochem. Cell. Biol. 32: 263, 2000, también Locus P09038 de la base de datos Swiss-Prot. Un mAb para una proteína humana también puede usarse en otras especies en las que el homólogo de la especie tiene reactividad cruzada antigénica con la proteína humana. En especies que carecen de dicha reactividad cruzada, se utiliza un anticuerpo con una especificidad apropiada para el homólogo de la especie presente en esa especie. Sin embargo, en experimentos con xenoinjertos en animales de laboratorio, se usa generalmente un mAb con especificidad para la proteína humana expresada por el xenoinjerto.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende los anticuerpos descritos en la presente memoria. Las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos contienen el mAb en un vehículo fisiológicamente aceptable, opcionalmente con excipientes o estabilizadores, en forma de soluciones liofilizadas o acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato o acetato a un pH típicamente de 5,0 a 8,0, más a menudo de 6,0 a 7,0; sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para hacer isotónicas; antioxidantes, conservantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrófilos tales como polisorbato 80, aminoácidos, carbohidratos, agentes quelantes, azúcares y otros ingredientes estándar conocidos por los expertos en la técnica (Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición, Osol, A. Ed. 1980). El mAb está típicamente presente a una concentración de 1-100 mg/ml, por ejemplo, 10 mg/ml.

En otra realización preferida, la invención proporciona un mAb anti-FGF2 de acuerdo con la invención en una formulación farmacéutica, para uso en un método de tratamiento de un paciente con una enfermedad. El mAb preparado en una formulación farmacéutica puede administrarse a un paciente por cualquier vía adecuada, especialmente parenteralmente por infusión intravenosa o inyección en bolo, intramuscular o subcutáneamente. La

infusión intravenosa se puede dar en tan sólo 15 minutos, pero más a menudo durante 30 minutos, o más de 1, 2 o incluso 3 horas. El mAb también puede ser inyectado directamente en el sitio de la enfermedad (por ejemplo, un tumor), o ser encapsulado en agentes portadores tales como liposomas. La dosis dada es suficiente al menos parcialmente para aliviar la afección que se está tratando ("dosis terapéuticamente eficaz") y es opcionalmente de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 mg/kg, pero puede ser tan alta como 10 mg/kg o incluso 15, 20 ó 30 mg/kg. También puede administrarse una dosis unitaria fija, por ejemplo, 100, 200, 500, 1000 ó 2000 mg, o la dosis puede basarse en el área superficial del paciente, por ejemplo, 1000 mg/m². Usualmente se administran entre 1 y 8 dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) para tratar el cáncer, pero se pueden administrar 10, 20 o más dosis. El mAb se puede administrar diariamente, quincenalmente, semanalmente, cada semana alterna, mensualmente o en algún otro intervalo, dependiendo, p. ej. de la vida media del mAb, durante 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 3-6 meses o más o hasta que la enfermedad progresa. También son posibles cursos repetidos de tratamiento, al igual que la administración crónica.

Una combinación de una dosis, frecuencia de administración y vía de administración eficaz para al menos aliviar parcialmente una enfermedad presente en un paciente que se está tratando se denomina régimen terapéuticamente eficaz. Una combinación de una dosis, frecuencia de administración y vía de administración eficaz para inhibir o retrasar el comienzo de una enfermedad en un paciente se denomina régimen profilácticamente eficaz.

Las enfermedades especialmente susceptibles al tratamiento con los mAbs anti-FGF2 de esta invención incluyen tumores sólidos que se cree que requieren angiogénesis, o que están asociados con niveles elevados de FGF2, o que están asociados con la expresión de FGF2. Tales tumores, para los cuales el tratamiento con el mAb de anti-FGF2 es apropiado, incluyen, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón (células pequeñas o no pequeñas), cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular o hepatoma (cáncer de hígado), tumores de cabeza y cuello, melanomas, sarcomas, carcinomas y tumores cerebrales (por ejemplo, gliomas tales como glioblastomas). Enfermedades malignas hematológicas tales como leucemias y linfomas y mieloma múltiple también pueden ser susceptibles a dicho tratamiento. Otras enfermedades asociadas con la angiogénesis para las que es adecuado el tratamiento con los mAbs anti-FGF de la invención incluyen degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), retinopatía diabética, glaucoma neovascular y otras enfermedades del ojo; psoriasis y otras enfermedades de la piel; y la artritis reumatoide.

En una realización preferida, el mAb anti-FGF2 se administra en combinación con (es decir, junto con, es decir, antes, durante o después) otra terapia. Por ejemplo, para tratar el cáncer, el mAb anti-FGF2 puede administrarse junto con uno o más de los fármacos quimioterapéuticos conocidos, por ejemplo, agentes alquilantes tales como carmustina, clorambucilo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona y ciclofosfamida; antimetabolitos tales como fluorouracilo, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, metotrexato e hidroxiurea; productos naturales incluyendo alcaloides de plantas y antibióticos tales como bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, etopósido, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vincristina, y Taxol (paclitaxel) o compuestos relacionados tales como Taxotere®; el inhibidor de topoisomerasa 1 irinotecan; agentes específicamente aprobados para tumores cerebrales incluyendo temozolomida y Gliadel® que contienen carmustina; e inhibidores de tirosina quinasas tales como Gleevec® (mesilato de imatinib), Sutent® (malato de sunitinib), Nexavar® (sorafenib), Tarceva® (erlotinib) e Iressa® (gefitinib); inhibidores de la angiogénesis; y todos los agentes anticancerosos aprobados y experimentales enumerados en el documento WO 2005/017107 A2. El mAb anti-FGF2 puede usarse en combinación con 1, 2, 3 o más de estos otros agentes usados en un régimen quimioterapéutico estándar. Normalmente, los otros agentes son aquellos que ya se sabe que son eficaces para el tipo particular de cáncer que se está tratando. El mAb anti-FGF2 es especialmente útil para superar la resistencia a fármacos quimioterapéuticos y por lo tanto aumentar su eficacia (véase Song et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8658, 2000).

Otros agentes con los que se puede administrar el mAb anti-FGF2 para tratar el cáncer incluyen agentes biológicos tales como anticuerpos monoclonales, incluyendo Herceptin™ frente al antígeno HER2; Avastin® contra VEGF; o anticuerpos contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) tales como Erbitux® (cetuximab) y Vectibix® (panitumumab). Los anticuerpos contra el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) son especialmente preferidos para su uso con el mAb anti-FGF2, incluyendo el mAb L2G7 (Kim et al., Clin Cancer Res 12: 1292, 2006 y la Patente de EE.UU. No. 7.220.410) y particularmente sus formas quiméricas y humanizadas tales como HuL2G7 (documento WO 07115049 A2); los mAbs anti - HGF humanos descritos en el documento WO 2005/017107 A2, particularmente 2.12.1; y las proteínas de unión a HGF descritas en los documentos WO 07143090 A2 o WO 07143098 A2; y otros mAbs anti-HGF neutralizantes que compiten por la unión con cualquiera de los mAb anteriormente mencionados. También se prefiere un mAb que se une al receptor cMet de HGF, por ejemplo el mAb anti-cMet OA-5D5 (Martens et al., Clin. Cancer Res. 12: 6144, 2006) que ha sido modificado genéticamente para tener sólo un "brazo", es decir, el dominio de unión. Además, el mAb anti FGF2 puede usarse junto con cualquier forma de cirugía y/o radioterapia incluyendo radiación de haz externo, radioterapia de intensidad modulada (IMRT) y cualquier forma de radiocirugía tal como, p. ej. Gamma Knife.

El tratamiento (por ejemplo, quimioterapia estándar) incluyendo el anticuerpo mAb anti-FGF2 puede aliviar una enfermedad aumentando la supervivencia mediana libre de progresión o el tiempo de supervivencia global de pacientes con cáncer en al menos 30% o 40% pero preferiblemente 50%, de 60% a 70% o incluso 100% o más, en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia) pero sin el mAb anti-FGF2. Además o

alternativamente, el tratamiento (por ejemplo, quimioterapia estándar) incluyendo el mAb anti-FGF2 puede aumentar la tasa de respuesta completa, la tasa de respuesta parcial o la tasa de respuesta objetiva (completa + parcial) de pacientes con estos tumores (por ejemplo, ovario, mama, pulmón, colon y glioblastomas, especialmente en caso de recaída o refractarios) en al menos 30% o 40%, pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o incluso 100% en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia) pero sin el mAb anti-FGF2.

Típicamente, en un ensayo clínico (por ejemplo, un ensayo de fase II, fase II/III o fase III), los citados incrementos en la supervivencia media libre de progresión y/o la tasa de respuesta de los pacientes tratados con quimioterapia más el mAb anti-FGF2, en comparación con el grupo de control de pacientes que recibieron quimioterapia sola (o más placebo), son estadísticamente significativos, por ejemplo en el nivel de $p = 0,05$ ó $0,01$ o incluso $0,001$. Las tasas de respuesta completa y parcial se determinan mediante criterios objetivos comúnmente utilizados en ensayos clínicos para el cáncer, por ejemplo, según se enumeran o aceptan por el Instituto Nacional del Cáncer y/o la Administración de Alimentos y Fármacos.

4. Los mAb de la invención para su uso en otros métodos

Los mAbs anti-FGF2 de la invención también pueden ser para su uso en un método diagnóstico o pronóstico. Los mAbs anti-FGF2 de la invención también encuentran su uso en métodos de laboratorio. Los mAbs pueden usarse para medir el nivel de FGF2 en un tumor o en la circulación de un paciente con un tumor, para determinar si el nivel es medible o incluso elevado, y por lo tanto seguir y guiar el tratamiento del tumor, ya que los tumores asociados con los niveles medibles o elevados de FGF2 serán más susceptibles al tratamiento con el mAb anti-FGF2. Por ejemplo, un tumor asociado con altos niveles de FGF2 sería especialmente susceptible al tratamiento con un mAb anti-FGF2. En realizaciones particulares, los mAb pueden usarse en un ELISA o radioinmunoensayo para medir el nivel de FGF2, por ejemplo, en una muestra de biopsia de tumor o en suero o en sobrenadante de medios de células secretadoras de FGF2 en cultivo celular. El uso de dos mAbs anti-FGF2 que se unen a diferentes epítopos (es decir, que no compiten por la unión) será especialmente útil en el desarrollo de un ELISA "sandwich" sensible para detectar FGF2. Para diversos ensayos, el mAb puede marcarse con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas por centrifugación, enzimas o radioisótopos, y puede proporcionarse en forma de kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de FGF2. En otros usos, los mAbs anti-FGF2 se utilizarán para purificar FGF2, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

Ejemplos

Ejemplo 1: Reactivos y ensayos

Preparación de GST-FGF2, FGF2-Fc y FGF2-Flag. La secuencia de cDNA para FGF2 humano (la forma precursora con 155 aminoácidos, Sommer et al., 1987) fue sintetizada (GenScript, Inc), amplificada por PCR y clonada en un derivado del vector pDisplay (Invitrogen). Estos plásmidos se transformaron en células BL21 (DE3) de E. coli y se indujo la expresión de FGF2 usando IPTG 1 mM. El nivel de expresión de FGF2 se determinó usando un kit de ELISA específico de FGF2 (R & D Systems), y FGF2 se purificó usando perlas de heparina-Sepharose CL-6B (Amersham Biosciences) como se describe (Wiedlocha et al., Mol. Cell. Biol. 16: 270, 1996). Las proteínas de fusión de FGF2 con glutamina sintetasa (GST-FGF2) respectivamente, péptido Flag (FGF2-Flag) y dominio Fc de IgG1 humano (aminoácidos de 216 a 446, FGF2-Fc), que se usaron en los ensayos de unión FGF2/FGFR así como para la inmunización, se produjeron de manera similar a partir de las construcciones genéticas apropiadas usando técnicas de biología molecular convencionales. Se purificó GST-FGF2 usando una columna anti-GST, se purificó FGF2-Fc usando una columna de proteína A/G y se usó FGF-Flag en sobrenadante de cultivo después de la determinación de la concentración de FGF2-Flag. Además, se adquirieron FGF2 humano purificado (QED Bioscience Inc.) y FGF2 murino (ProSpec-Tany Technogene Ltd.).

Preparación de proteínas FGFR-Fc. El dominio extracelular (ECD) de FGFR1 alfa humano (IIIc) (designado como FGFR1c) y FGFR2c alfa humano (IIIc) (designado como FGFR2c) se expresaron como moléculas de inmunoadhesina. Fragmentos de ADN que codifican el ECD entero de FGFR1c y FGFR2c se fusionaron a Fc humano a través de un enlazador polipéptido. Estas moléculas de FGFR-Fc se expresaron transfectando células 293F humanas y seleccionando transfectantes 293 estables en presencia de G418 (1 mg/ml) en medio de expresión 293 (Invitrogen). El FGFR-Fc secretado a partir de células transfectadas con 293F se purificó usando una columna de proteína A/G. Además, FGFR3c-Fc humano y la fusión de FGFR4-Fc humano se obtuvieron de R & D Systems.

Síntesis de fragmentos de FGF2. Los péptidos que consisten en los residuos de aminoácidos 29-44 (péptido nº 1), 101-118 (péptido nº 3) y 137-155 (péptido nº 4) de FGF2 fueron sintetizados por SynBioSci. Se añadieron residuos de cisteína adicionales al extremo C del péptido nº1 y nº3 y al extremo N del péptido nº4. Estos fragmentos de péptido se conjugaron a continuación con hemocianina de lapa (KLH).

ELISA de unión a FGF2. Los pocillos del ELISA se revistieron con 50 µg/ml de heparina (Sigma) durante la noche a 4°C y luego se incubaron con 0,3-1 µg/ml de FGF2 humano o de ratón durante 1 h a temperatura ambiente (RT) para que la heparina pudiera capturar el FGF2. Después de bloquear con BSA al 2% durante 1 hora a TA, se añadieron sobrenadantes de cultivo de hibridoma o mAbs purificados durante 1 hora a TA. Los anticuerpos anti-FGF2 unidos se detectaron mediante la adición de IgG Fc HRP-de cabra anti-ratón durante 1 h a RT, seguido de

lavado, adición de sustrato TMB (Sigma) y lectura a 450 nm.

ELISA de unión de FGFR-Fc/FGF2-Flag. La actividad de bloqueo de los mAbs anti-FGF2 se determinó en el ELISA de unión a FGFR-Fc/FGF2-Flag. Los pocillos de ELISA se revistieron con 2 µg/ml de anticuerpo de cabra específico para IgG-Fc humano durante la noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 2% durante 1 h a RT, los pocillos se incubaron con 0,5 µg/ml de FGFR1c-Fc, FGFR2c -Fc, FGFR3c-Fc o FGFR4-Fc durante 1 h. Después del lavado, los pocillos se incubaron con FGF2-Flag (0,2 µg/ml) en presencia de diversas concentraciones de mAbs durante 1 h. El FGF2-Flag unido se detectó mediante la adición del anticuerpo HRP-anti-Flag M2 (Sigma).

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales

Se inmunizaron ratones Balb/c (hembras de 5 a 6 semanas de edad) por inyección en sus patas traseras 14 veces a intervalos de una semana con péptidos sintéticos FGF2 conjugados con GST-FGF2, FGF2-Fc y/o KLH, resuspendidos en MPL/TDM (Sigma -Aldrich), como se describe en la tabla siguiente. Tres días después de la inyección final, las células linfoides poplíteas se fusionaron con células de mieloma de ratón P3/X63-Ag8U1 usando métodos de fusión estándar con polietilenglicol al 35% como se describe (Chuntharapai et al., Methods Enzymol 288: 15, 1997). Diez días después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo de hibridoma se seleccionaron para determinar su capacidad para unirse a FGF2 usando el ELISA de unión a FGF2 descrito anteriormente. Se seleccionaron los mAbs seleccionados para detectar sus actividades de bloqueo en el ELISA de unión a FGFR1-Fc/FGF-Flag. Los hibridomas seleccionados se clonaron a continuación dos veces utilizando la técnica de dilución limitativa como se describe (Harlow et al., 1988).

Tabla: Protocolo de inmunización

Inyección No.	Antígenos (en MPL/TDM) por almohadilla plantar
1	GST-FGF2 10 µg
2	GST-FGF2 5 µg
3	GST-FGF2 2,5 µg
4-7	GST-FGF2 5 µg
8-9	GST-FGF2 10 µg
10	GST-FGF2 (5 µg) + FGF2-Fc (5 µg)
11	FGF2-Fc (2 µg) + Péptido N° 1 y N° 3 (2 µg)
12	FGF2-Fc (2 µg) + Péptido N° 1, N° 3 y N° 4 (3 µg)
14	FGF2-Fc 2 µg

La FIG. 1 muestra que el mAb GAL-F2 generado de esta manera se une tanto al FGF2 humano como al FGF2 de ratón, aproximadamente igual de bien, mientras que un mAb IgG de ratón de control negativo no se une al FGF2. La FIG. 2 muestra que GAL-F2 pero no el mAb de control 5G8 es capaz de inhibir la unión de FGF2 humano a cada uno de los cuatro receptores FGFR1-4 de FGF. En otro experimento utilizando el ELISA de unión a FGFR-Fc/FGF2-Flag, GAL-F2 (a una concentración de 10 µg/ml) inhibió completamente la unión de FGF2 a cada uno de los cuatro FGFRs-FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4-es decir, redujo la señal al nivel de fondo dentro del error experimental, mientras que los mAbs anti-FGF2 bFM-1 y 3H3 redujeron la unión sustancialmente pero no completamente.

Ejemplo 3: Epítipo de GAL-F2

Se compraron varios mAbs anti-FGF2 comercialmente disponibles que se han descrito como que tienen ciertas actividades neutralizantes-3H3 (Calbiochem), mAb bFM-1 (Millipore) y mAb FB-8 (Abcam). Se realizó un ELISA de unión competitiva para determinar si GAL-F2 tiene el mismo epítipo que cualquiera de estos mAbs. Las placas de ELISA se recubrieron con 50 µl/pocillo de heparina (50 µg/ml) durante la noche, se decantaron e incubaron con 50 µl/pocillo de FGF2 durante 1 hora. Después de bloquear con BSA al 2%, los pocillos se incubaron con 0,5 µg/ml de mAb GAL-F2 biotinilado en presencia de varias concentraciones de cada mAb anti-FGF2 a ensayar. El nivel de la unión de GAL-F2 biotinilada al FGF2 en cada pocillo se detectó mediante la adición de HRP-estreptavidina seguido de sustrato de TMB. La FIG. 3 muestra que ninguno de los mAbs 3H3, bFM-1 y FB-8 ni un mAb de ratón de control negativo (mlgG) compitió por la unión a FGF2 con GAL-F2, mientras que, por supuesto, GAL F2 compitió con sí mismo. Por lo tanto, ningún mAb anti - FGF2 anterior probado tiene el epítipo igual o que se superpone en FGF2 como GAL - F2.

Ejemplo 4: Inhibición de la proliferación inducida por FGF2 por GAL-F2

Se mantienen células BaF3 (DSMZ, Alemania) en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con FCS al 10%, medio condicionado con WEHI-3 al 10% y antibióticos. FGFR1c estable o FGFR2c que expresan células Ba/F3 fueron generadas por electroporación de ADN del vector de expresión de FGFR1c linealizado y FGFR2c como se describe (Ornitz et al., 1996). Las células transfectadas estables se seleccionan usando G418 (600 µg/ml) durante 10 días. Se demostró que los transfectantes Ba/F3 estables que expresan FGFR1c o FGFR2c proliferan en respuesta al FGF2 en ausencia de medio WEHI-3. Para determinar la actividad de bloqueo (neutralización) del mAb GAL-F2, se lavaron las células BaF3 que expresan FGFR1c o FGFR2c (10.000 células/pocillo) y se resuspendieron en RPMI con FCS al 10% más 2 µg/ml de heparina y 20 ng/ml de FGF-2 en presencia de diversas concentraciones de GAL-F2. Después de la incubación durante 36-48 horas a 37°C, 5% de CO₂, el nivel de proliferación se determinó mediante la adición de WST-1 (Roche Applied Science) durante 2 h. La FIG. 4 muestra que GAL F2 inhibió la proliferación inducida por FGF2, casi completamente a 10 µg/ml de mAb.

Las actividades de bloqueo de GAL-F2 en células epiteliales normales se determinaron usando células epiteliales de pulmón de visón Lu Mv1 (CCL-64 de ATCC). Se resuspendieron células Mv 1 Lu (2 x 10³ células/100 µl/pocillo) crecidas en DMEM que contenía FCS al 10% en DMEM libre de suero y se estimularon con 1-2 ng/ml de FGF2, más 1 ng/ml de TGF-β para inhibir la proliferación de fondo, en presencia de diversas concentraciones de mAb durante 24 h. El nivel de proliferación celular se determinó mediante la adición de WST-1 (Roche Applied Science) durante 24-48 horas. La FIG. 5 muestra que GAL-F2 inhibió la proliferación inducida por FGF2 de las células de Mv1 Lu, casi completamente a 1 µg/ml de mAb. En un experimento similar, GAL-F2 inhibió la proliferación de HUVEC inducida por FGF2 10 ng/ml, en aproximadamente 75% a una concentración de 0,1 µg/ml (es decir, a una relación aproximadamente equimolar a FGF2) y completamente a una concentración de 1,0 µg/ml. Esto era algo mejor que el grado de inhibición por el mAb anti-FGF2 de bFM-1 y sustancialmente mejor que por el mAb anti-FGF2 3H3, y sugiere que GAL-F2 inhibe la angiogénesis, ya que la proliferación de células endoteliales es un paso esencial en la angiogénesis.

Ejemplo 5: Ensayo clonógeno

La actividad antitumoral de GAL-F2 se investigó in vitro por su efecto sobre la formación de colonias de células tumorales humanas en agar blando. El ensayo se realizó de la siguiente manera: Se recubrieron placas de 6 pocillos con 1,5 ml/pocillo de agar al 0,6% en DMEM que contenía FCS al 10% y luego se añadieron capas con 1,5 ml de agar al 0,3% en DMEM con FCS al 10%. La capa de agar superior se mezcló con 2 x 10⁴ células tumorales de hepatoma humano SMMC - 7721 más 10 µg/ml de mAb. Las placas se incubaron a 37°C en un incubador humidificado durante 10 a 14 días y luego se tiñeron con 0,005% de violeta de cristal durante 1 hora y se examinaron por fotomicroscopia. La FIG. 6 muestra que en comparación con las células en presencia de mAb de IgG de ratón de control irrelevante, las células en presencia de GAL-F2 formaron muchas menos colonias, mientras que el mAb anti-FGF2 de bFM-1 no redujo el número de colonias. Por lo tanto, GAL-F2 inhibió la formación de colonias en agar blando de células tumorales humanas.

Ejemplo 6: Ensayo de angiogénesis

La actividad antiangiogénica de GAL-F2 se determinó en ratones BALB/c inyectados en la espalda con 0,4 ml de matrigel (BD Biosciences) con o sin 30 ng de FGF2 y/o 3 µg de GAL-F2. Los tapones de Matrigel se cosecharon para la fotografía el día 6. FGF2 estimuló la formación de vasos sanguíneos en este ensayo, mientras que GAL-F2 inhibió al menos parcialmente esta estimulación.

Ejemplo 7: Modelos de Xenoinjertos

Los experimentos de xenoinjerto se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Kim et al., Nature 362: 841, 1993). Las células tumorales humanas cultivadas típicamente en medio DMEM completo se recogen en HBSS. Se inyectan subcutáneamente ratones desnudos atímicos hembras o ratones de NIH-III Xid/Beige/nude (4-6 semanas de edad) con 2-10 x 10⁶ células en 0,1 ml de HBSS en las zonas dorsales. Cuando el tamaño del tumor alcanza 50-100 mm³, los ratones se agrupan aleatoriamente y se administran 5 mg/kg (100 µg de total) de mAbs i.p. dos veces por semana en un volumen de 0,1 ml. Los tamaños del tumor se determinan dos veces por semana midiendo en dos dimensiones [longitud (a) y ancho (b)]. El volumen tumoral se calcula según $V = ab^2/2$ y se expresa como volumen tumoral medio ± SEM. El número de ratones en cada grupo de tratamiento es típicamente 5-7 ratones. El análisis estadístico puede realizarse, por ejemplo, usando la prueba t de Student.

La FIG. 7 muestra que GAL-F2 inhibió fuertemente el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon de RPMI 4788, y la FIG. 8 muestra que el mAb anti-FGF2 de bFM-1 inhibe el crecimiento de xenoinjertos en menor medida que GAL-F2. La FIG. 9 muestra que GAL-F2 inhibió xenoinjertos tumorales de hepatoma SMMC-7721 en ratones Xid/Beige/nude, mientras que el fármaco quimioterapéutico cisplatino a 5 mg/kg una vez por semana inhibió el crecimiento de xenoinjertos en menor grado. La combinación de GAL-F2 y cisplatino inhibió más fuertemente que cualquiera de los agentes solos, mostrando un efecto aditivo o sinérgico de estos agentes. La FIG. 10 muestra que GAL-F2 inhibió xenoinjertos de tumor de hepatoma HepG2 en ratones desnudos más fuertemente que el mAb M225 de receptor anti-EGF del que se derivó Erbitux®, pero la combinación de GAL-F2 y M225 inhibió algo más fuertemente que cualquiera de los agentes, de nuevo mostrando un efecto aditivo o sinérgico de estos agentes. Sin embargo, GAL F2 no fue capaz de inhibir el crecimiento de todos los xenoinjertos probados, posiblemente porque no

son dependientes de FGF2 para su crecimiento.

Ejemplo 8: Humanización de GAL-F2

La clonación de las regiones variables de la cadena ligera y pesada del mAb GAL-F2, la construcción y expresión de un mAb quimérico, y el diseño, construcción, expresión y purificación de un mAb GAL-F2 humanizado se realizaron todos utilizando métodos estándar de biología molecular, p. ej., como se describe en el documento de EE.UU. N° 2008 0019974 para el mAb L2G7. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera (madura) y pesada (V) de GAL-F2 se muestran respectivamente en las Figs. 11A y 11B, líneas superiores marcadas GAL - F2. Más específicamente, para diseñar un mAb GAL-F2 humanizado, se siguieron generalmente los métodos de Queen et al., Pat. de EE.UU. números 5.530.101 y 5.585.089. La secuencia Vk humana ABA70776 y la secuencia VH AAL04519, como se muestra respectivamente en las Figs. 11A y 11B, líneas de fondo, se eligieron respectivamente para servir como secuencias aceptoras para las secuencias VL y VH de GAL-F2 porque tienen una homología de estructura particularmente alta (es decir, identidad de secuencia). Un modelo molecular generado por ordenador del dominio variable GAL-F2 se utilizó para localizar los aminoácidos en el marco GAL-F2 que están lo suficientemente cerca de las CDR para interactuar potencialmente con ellos. Para diseñar las regiones variables de la cadena ligera y pesada de GAL-F2 humanizadas, las CDR del mAb GAL-F2 de ratón fueron primeramente injertadas conceptualmente en las regiones del marco del aceptor. En posiciones de marco en las que el modelo informático sugirió un contacto significativo con las CDR, que pueden ser necesarias para mantener la conformación de CDR, los aminoácidos del anticuerpo de ratón se sustituyeron por los aminoácidos marco humanos. Para el mAb GAL-F2 humanizado designado HuGAL-F2, esto se realizó en los residuos 1, 27 y 30 (los residuos 27 y 30 se encontraban dentro del bucle H1 hipervariable de Chothia), 48, 67, 71 y 94 de la cadena pesada y sin residuos en la cadena ligera, utilizando la numeración de Kabat. Las secuencias de la región V de cadena ligera y pesada de HuGAL-F2 se muestran en las Figs. 11A y 11B, respectivamente, líneas intermedias marcadas con HuGAL-F2, donde están alineadas contra las respectivas regiones V de donante GAL-F2 y aceptor humano-las CDR (como se define por Kabat) están subrayadas y los aminoácidos sustituidos enumerados anteriormente están doblemente subrayados.

La invención proporciona no sólo un mAb HuGAL-F2 de GAL-F2 humanizado que incluye las regiones V de cadena ligera y pesada mostradas en la FIG. 11, sino también los mAbs GAL-F2 humanizados variantes cuyas regiones variables de cadena ligera y pesada difieren de las secuencias de HuGAL-F2 por un número pequeño (por ejemplo, típicamente no más de 1, 2, 3, 5 ó 10) de sustitutos, deleciones o inserciones, usualmente en el marco pero posiblemente en las CDR. En particular, sólo puede hacerse un subconjunto de las sustituciones descritas anteriormente en los marcos aceptor, o pueden hacerse sustituciones adicionales, por ejemplo, el aminoácido 69L de VH de GAL-F2 de ratón puede sustituir al aminoácido aceptor 69I, o los aminoácidos de ratón pueden sustituir los respectivos aminoácidos en la cadena ligera humanizada en cualquiera o todas las posiciones 1, 3, 60 y/o 67 por numeración de Kabat. Por otra parte, el aminoácido VH 1E (Glu) puede ser Q (Gln). De hecho, muchos de los restos marco no en contacto con las CDR en HuGAL-F2 pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes de GAL-F2 u otros anticuerpos de ratón o humanos e incluso muchos residuos potenciales de contacto con CDR también son susceptibles de sustitución o incluso aminoácidos dentro de las CDR pueden ser alterados. Un ejemplo de una sustitución de CDR es sustituir un residuo en una CDR con el residuo que ocupa la posición correspondiente de la secuencia de aceptor humano usada para suministrar marcos de región variable.

Muy a menudo, los reemplazos realizados en las secuencias GAL-F2 humanizadas variante son conservadores con respecto a los aminoácidos sustituidos de HuGAL-F2. Los aminoácidos se pueden agrupar como sigue para determinar sustituciones conservativas, es decir, sustituciones dentro de un grupo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de las cadenas): gly, pro; y el Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe.

Preferiblemente, los sustituyentes en HuGAL-F2 (conservadores o no) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad de unión o potencia del mAb humanizado, es decir, su capacidad para neutralizar las actividades biológicas de FGF2 (por ejemplo, la potencia en algunos o en todos los ensayos descritos en este documento del mAb GAL-F2 humanizado variante es esencialmente la misma, es decir, dentro del error experimental, que la de HuGAL-F2). Preferiblemente, las secuencias de la región V de la cadena ligera y pesada de la variante madura son al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 98% idénticas a las respectivas regiones V de la cadena ligera y pesada madura HuGAL - F2. Alternativamente, otras regiones variables de anticuerpo humano con alta identidad de secuencia con las de GAL-F2 son también adecuadas para proporcionar el marco del anticuerpo humanizado, especialmente regiones V kappa del subgrupo humano I y de V de cadena pesada del subgrupo humano I, o secuencias de consenso de estos subgrupos.

En otros anticuerpos humanizados, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o todas las siete posiciones de las sustituciones aceptor a donador mencionadas en relación con el anticuerpo ejemplificado (es decir, H1, H27, H30, H48, H67, H71 y 94) están preferiblemente ocupadas por el residuo que ocupa la posición correspondiente de la cadena pesada del anticuerpo donador de ratón. Si la secuencia aceptor de cadena pesada es distinta a la de AAL04519, puede ser necesaria o no una sustitución aceptor a donador para la ocupación especificada de una posición de región de marco variable particular dependiendo de si el residuo que ocupa la posición especificada ya es el mismo entre el

aceptor y el donante.

El mAb HuGAL-F2 ejemplar discutido en este documento tiene regiones constantes κ y $\gamma 1$ humanas, por ejemplo, tal como se presenta en el documento de EE.UU. N° 2008 0019974, y por lo tanto es una IgG1. Las secuencias completas de las cadenas ligeras y pesadas (maduras) de HuGAL-F2 se muestran en la FIG. 13. De este modo, un anticuerpo humanizado ejemplar comprende una cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada de SEQ ID NO: 8. Aunque estas secuencias son respectivamente de los alotipos Km (3) y G1m (3), se entiende que los mAbs IgG1 de cualquier alotipo (IgG1, κ) están englobados por la designación HuGAL-F2. También se entenderá que cuando se fabrica HuGAL-F2 mediante procedimientos convencionales, pueden añadirse uno a varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina C-terminal de la cadena pesada ausentes o derivatizados en una proporción o en todas las moléculas, y dicha composición seguirá comprendida por la designación HuGAL-F2 y se considerará un mAb GAL-F2 humanizado. Se pueden preparar mAbs humanizados de otros isotipos (por ejemplo, IgG2, IgG3 e IgG4) combinando las regiones variables de HuGAL - F2 con las regiones constantes humanas apropiadas. Se pueden realizar sustituciones en las regiones constantes de HuGAL-F2 para reducir o aumentar la función efectora, tales como citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; Tso et al. Patente de Estados Unidos N° 5.834.597 y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), o prolongar la semivida en seres humanos (véase, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Específicamente, pero sin limitación, HuGAL-F2 que tiene mutaciones en la región constante de IgG a un Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 son realizaciones de la presente invención.

Para comparar la afinidad de unión de HuGAL-F2 con la del mAb quimérico ratón-humano ChGAL-F2, se realizó un experimento de unión competitiva usando tecnología ELISA estándar. Específicamente, el FGF2 humano se inmovilizó en una placa ELISA revestida con heparina. Los pocillos se incubaron con mAb GAL-F2 biotinilado (0,5 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de concentraciones crecientes de ChGAL-F2 no marcado, HuGAL-F2 o anticuerpo humano de control hIgG. El nivel de GAL-F2 biotinilado se determinó mediante la adición de HRP-estreptavidina y sustrato. Como se muestra en la FIG. 12, HuGAL-F2 y ChGAL-F2 compitieron aproximadamente igualmente bien, con HuGAL-F2 posiblemente ligeramente mejor, lo que indica que la afinidad de unión para FGF2 de HuGAL-F2 es al menos tan alta como ChGAL-F2 y por lo tanto como el mAb GAL- F2 original de ratón. A partir de la concentración de HuGAL-F2 requerida para inhibir la unión del mAb marcado en un 50%, se puede estimar que la afinidad de unión K_a de HuGAL-F2 para FGF2 es al menos aproximadamente 10^9 M^{-1} . El HuGAL-F2 también se puede ensayar en cualquiera de los ensayos biológicos para determinar la actividad FGF2 descrita en el presente documento, e inhibirá la actividad del FGF2 de manera comparable al mAb GAL-F2.

En la invención, a menos que aparezca otra cosa a partir del contexto, cualquier etapa, elemento, realización, característica o aspecto de la invención se puede usar con cualquier otro. Si más de una secuencia está asociada con un número de acceso en momentos diferentes, se pretende la secuencia asociada con el número de acceso al 29 de mayo de 2008. En el caso de cualquier discrepancia entre secuencias correspondientes en las figuras y la lista de secuencias, el orden de las figuras prevalece.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal GAL-F2, Número ATCC PTA-8864, se ha depositado en la American Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, Va. 20108, el 8 de enero de 2008 bajo el Tratado de Budapest. Este depósito se mantendrá en un depósito autorizado y se reemplazará en caso de mutación, no viabilidad o destrucción durante un período de al menos cinco años después de que la última solicitud de liberación de una muestra haya sido recibida por el depositario durante un período de al menos treinta años después de la fecha del depósito, o durante la vigencia de la patente relacionada, cualquier período que sea más largo. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de estas líneas celulares serán irrevocablemente eliminadas tras la emisión de una patente de la solicitud.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Galaxy Biotech, LLC

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES AL FACTOR BÁSICO DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

<130> 022382-000820PC

<140> EP 09 759089.7

10 <141> 29-05-2009

<150> US 61/057,183

<151> 29-05-2008

15 <150> US 61/170561

<151> 17-04-2009

<160> 8

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<223> GAL-F2

30 <400> 1

```

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
          20           25           30
Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
          50           55           60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
          65           70           75           80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 2

35 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> HuGAL-F2

<400> 2

```

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

```

45

ES 2 633 297 T3

```

      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

<210> 3
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> región variable de cadena ligera kappa inmunoglobulina

10 <400> 3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20      25      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

15 <210> 4
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> GAL-F2

<400> 4

```

Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20      25      30
Val Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35      40      45
Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Lys Glu Gly Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
      100      105      110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

25 <210> 5
 <211> 121
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HuGAL-F2

35 <400> 5

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> región variable de cadena pesada inmunoglobulina

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gly Gln Leu Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena ligera anticuerpo HuGAL-F2

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
 20 25 30
 Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada anticuerpo HuGAL-F2

10

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Glu Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une y neutraliza el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (FGF2), en el que el mAb es quimérico, humanizado o humano y compite por la unión a FGF2 con, y se une al mismo epítipo que, un anticuerpo producido por el hibridoma PTA-8864, y en el que el mAb inhibe el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón.
2. Un mAb según la reivindicación 1 que inhibe completamente la unión de FGF2 a cada uno de los receptores de FGF FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4.
3. Un mAb según la reivindicación 1, en el que el mAb comprende:
 - primera, segunda y tercera CDRs de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos KASQSVSSDVG, SGSNRYS y QQDYYSPTWT respectivamente; y
 - primera, segunda y tercera CDRs de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos NYVIN, YNDPYNDVSKYNEKFKG y EGGGKYVYAMDS respectivamente.
4. Un mAb según la reivindicación 1 que es una forma quimérica o humanizada de un mAb producido por el hibridoma PTA-8864.
5. Un mAb según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado, y que comprende:
 - una cadena ligera humanizada que comprende una primera, segunda y tercera CDR que tienen las secuencias de aminoácidos KASQSVSSDVG, SGSNRYS y QQDYYSPTWT, respectivamente; y
 - una cadena pesada humanizada que comprende una primera, segunda y tercera CDR que tienen las secuencias de aminoácidos NYVIN, YNDPYNDVSKYNEKFKG y EGGGKYVYAMDS, respectivamente.
6. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que los residuos H1, H27, H30, H48, H67, H71 y H94 por la numeración de Kabat de su cadena pesada están ocupados por el residuo que ocupa las posiciones H1, H27, H30, H48, H67, H71 y H94 respectivamente de la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 4, es decir, están ocupados por los aminoácidos E, Y, T, I, A, S y K, respectivamente.
7. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región variable de cadena ligera tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 y la cadena pesada tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5.
8. Un mAb según la reivindicación 1, que es un fragmento Fab o F(ab')₂ o un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo híbrido bifuncional.
9. Una composición farmacéutica que comprende un mAb que se une y neutraliza el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (FGF2), y en el que el mAb comprende:
 - primera, segunda y tercera CDRs de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos KASQSVSSDVG, SGSNRYS y QQDYYSPTWT respectivamente; y
 - primera, segunda y tercera CDRs de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos NYVIN, YNDPYNDVSKYNEKFKG y EGGGKYVYAMDS respectivamente, y en las que el mAb inhibe el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón.
10. Una composición farmacéutica que comprende un mAb según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica según la reivindicación 9 para uso en el tratamiento del cáncer en un paciente.

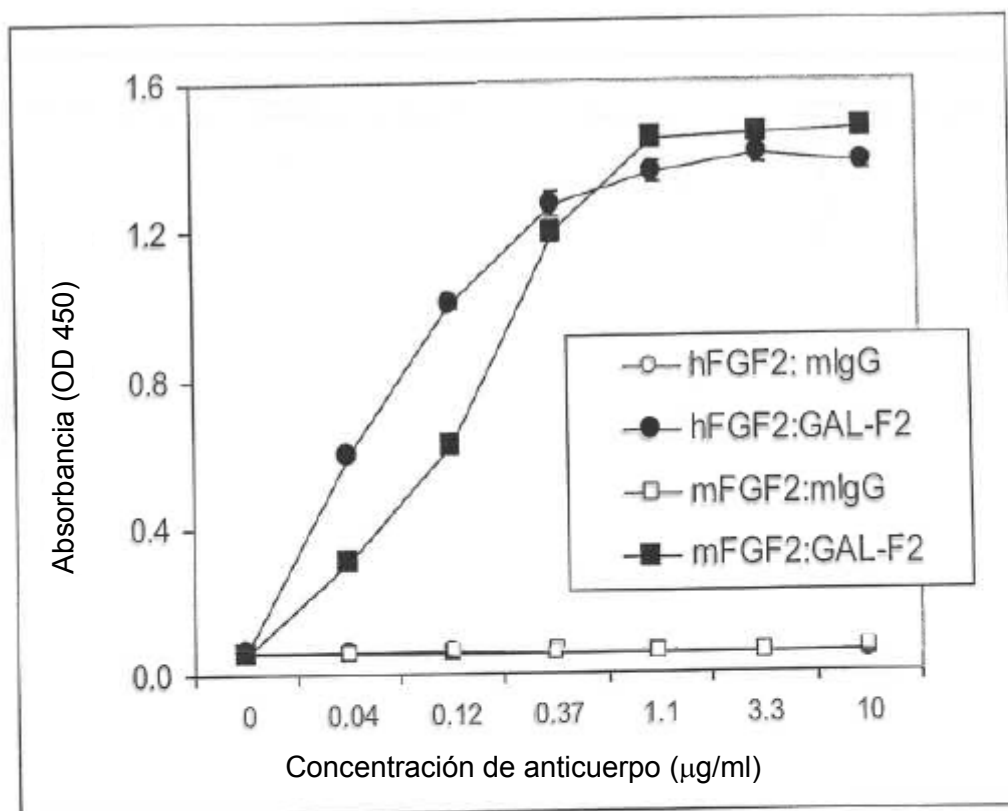


FIGURA 1

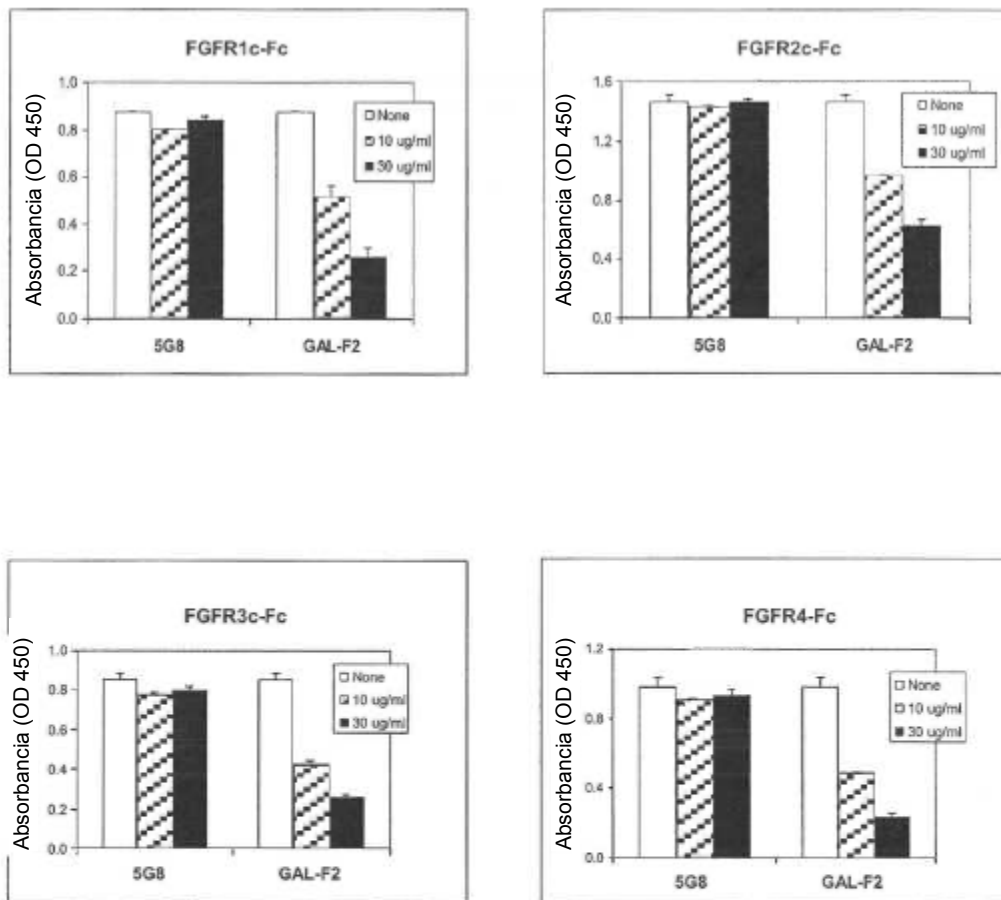


FIGURA 2

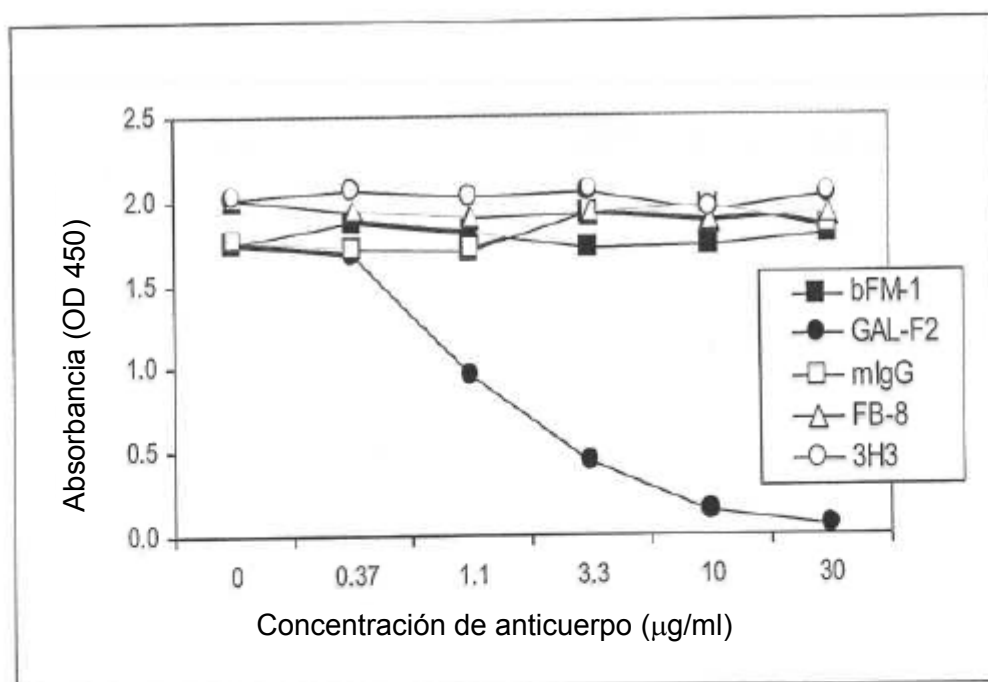


FIGURA 3

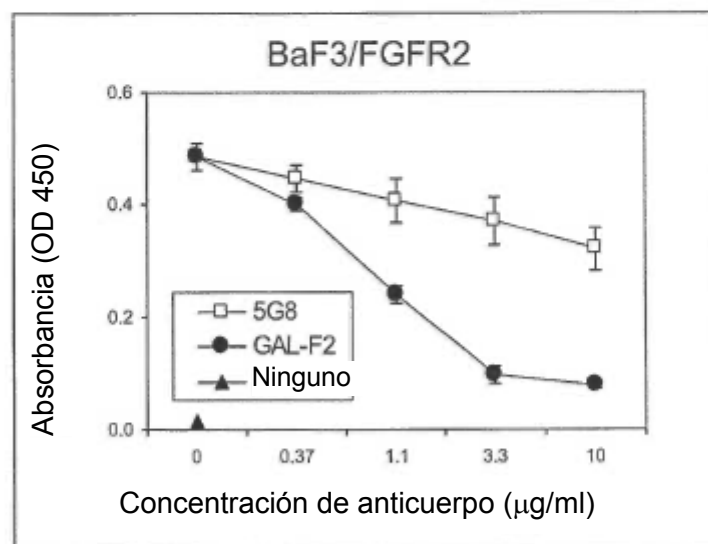
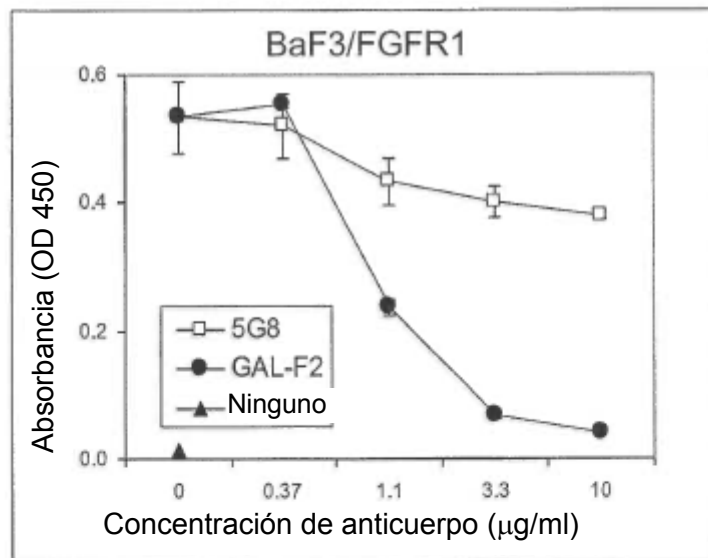


FIGURA 4

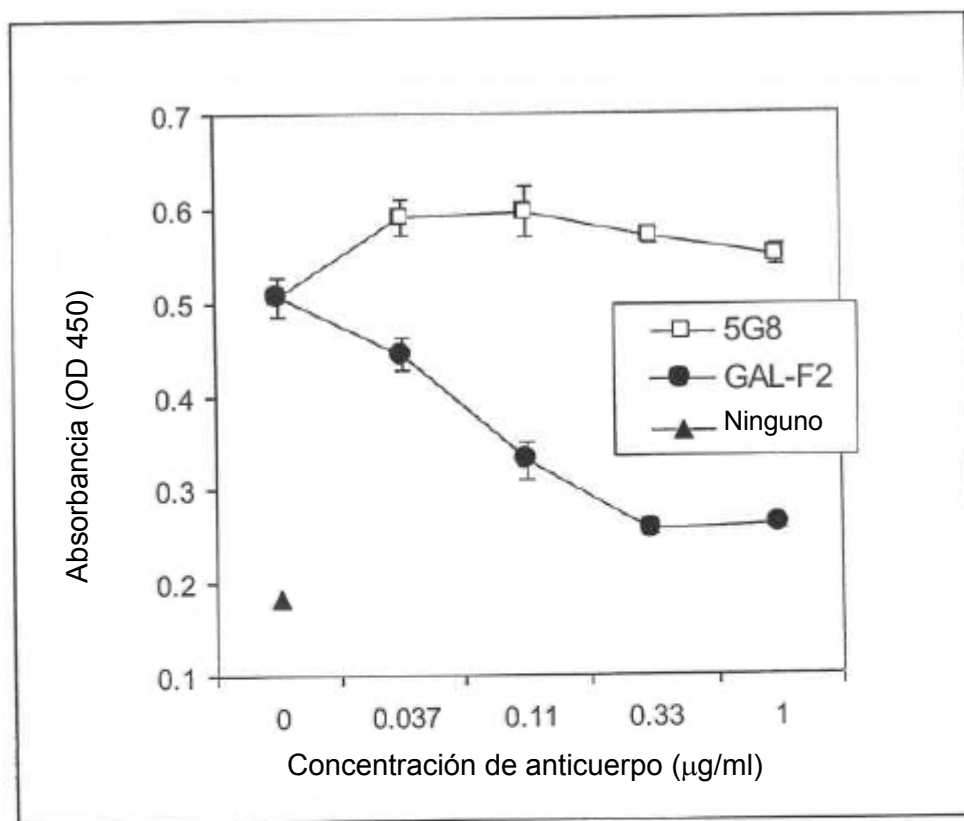
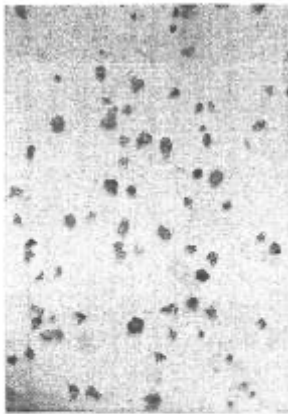
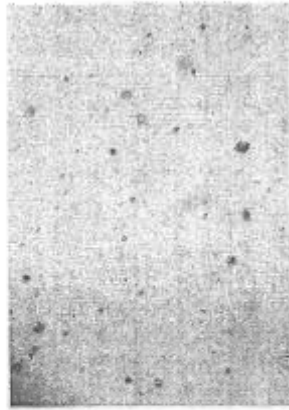


FIGURA 5



mlgG



GAL-F2



bFM-1

FIGURA 6

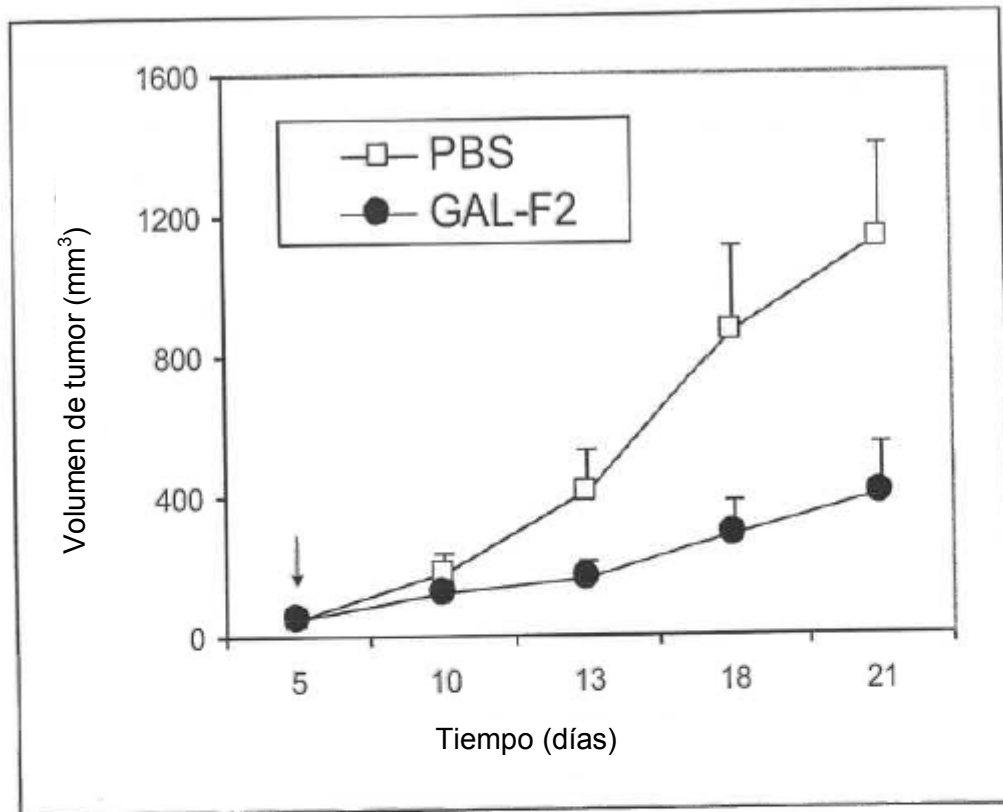


FIGURA 7

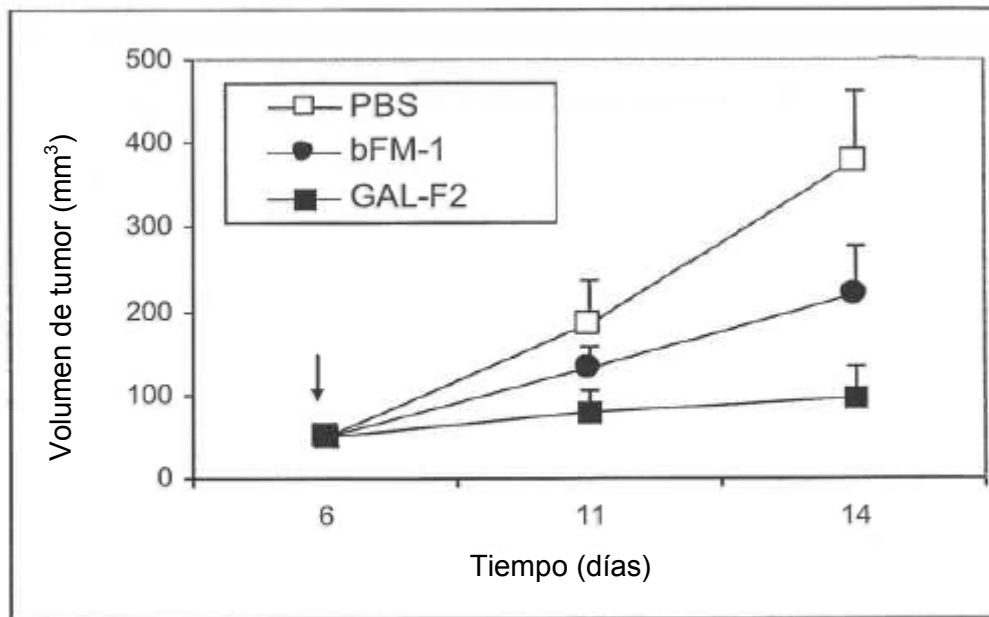


FIGURA 8

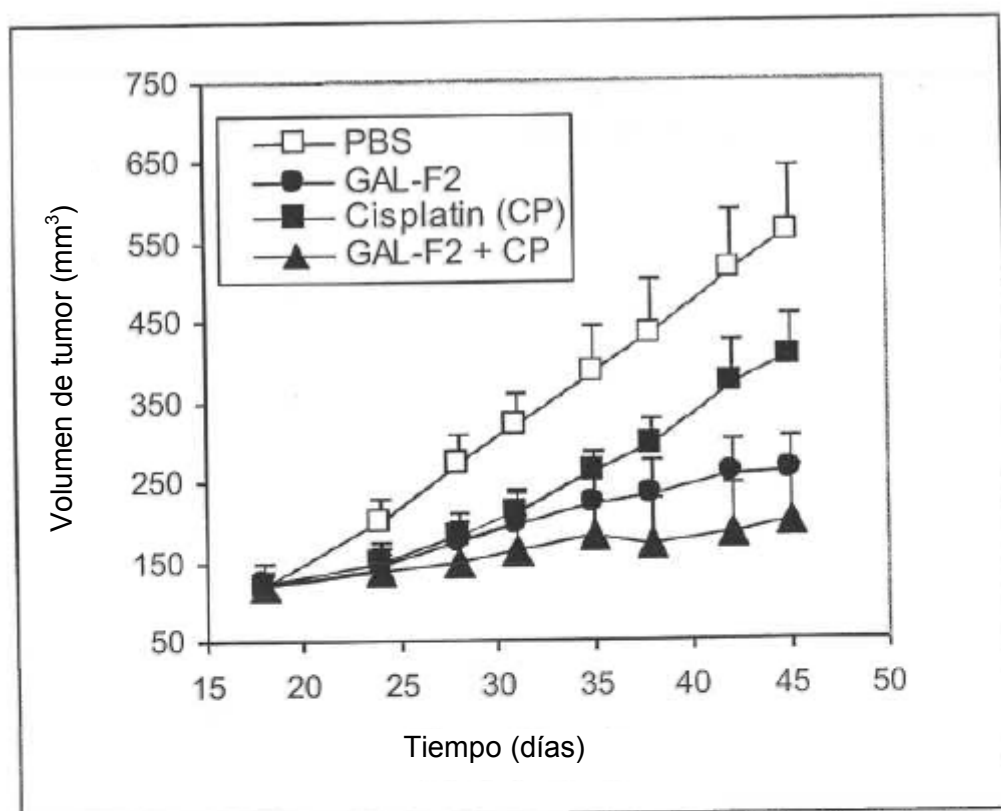


FIGURA 9

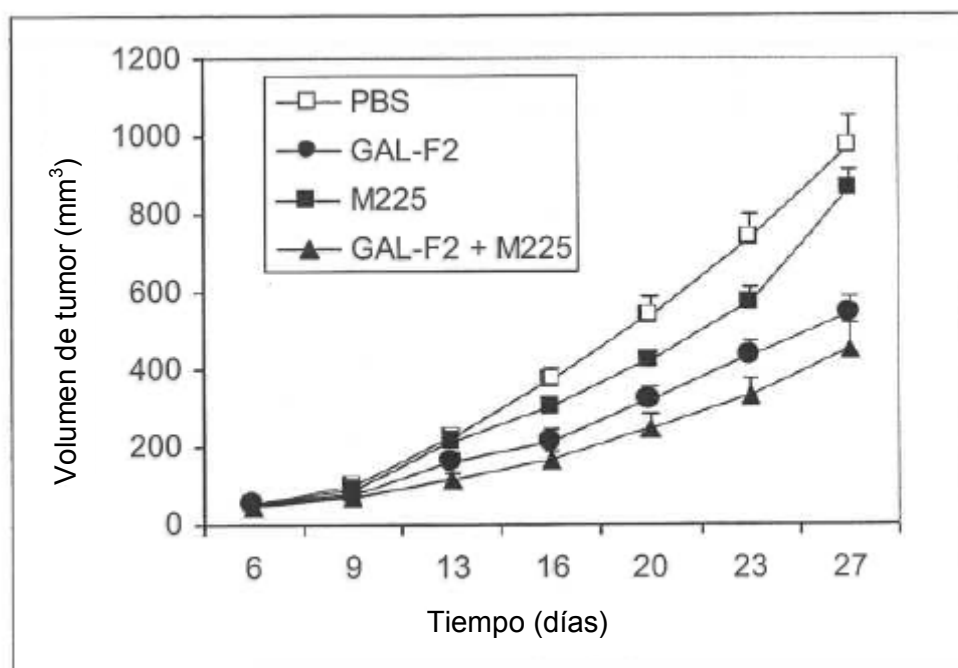


FIGURA 10

A

	1	2	3	4
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-F2	SIVMTQTPKF	LLVSAGDRVT	MTCKASQSVS	SDVGWYQQKP
HuGAL-F2	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASQSVS	SDVGWYQQKP
ABA70776	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCrasqsis	sylnWYQQKP

	5	6	7	8
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-F2	GQSPKLLIYS	GSNRYSGVPD	RFTGSGYGT	FTFTISTVQA
HuGAL-F2	GKAPKLLIYS	GSNRYSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
ABA70776	GKAPKLLIYa	asslqsGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP

	9	10
	1234567890	1234567890 1234567
GAL-F2	EDLAVYFCQQ	DYYSPWTFGG GTKLEIK
HuGAL-F2	EDFATYYCQQ	DYYSPWTFGQ GTKVEIK
ABA70776	EDFATYYCqq	systpwtFGQ GTKVEIK

B

	1	2	3	4
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-F2	EVHLQQSGPE	LVKPGASVKM	SCKASGYTFT	NYVINWVKQK
HuGAL-F2	EVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYTFT	NYVINWVRQA
AAL04519	QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGCTFS	syaisWVRQA

	5	a	6	7	8
	1234567890	12234567890	1234567890	1234567890	
GAL-F2	PGQGLEWIGY	NDPYNDVSKYN	EKFKGKATLT	SDKSSSTAYM	
HuGAL-F2	PGQGLEWIGY	NDPYNDVSKYN	EKFKGRATIT	SDKSTSTAYM	
AAL04519	PGQGLEWMGg	iipifgtanya	qkfqqRVTIT	ADKSTSTAYM	

	abc	9	10ab cd	11
	1222234567890	123456789000	00	1234567890123
GAL-F2	ELSSLTSEDSAVY	YCAKEGGGKYVY	AM	DSWGQGTSTVTVSS
HuGAL-F2	ELSSLRSEDVAVY	YCAKEGGGKYVY	AM	DSWGQGTSTVTVSS
AAL04519	ELSSLRSEDVAVY	YCARvgqlgyyyyygm		dvWGQGTSTVTVSS

FIGURA 11

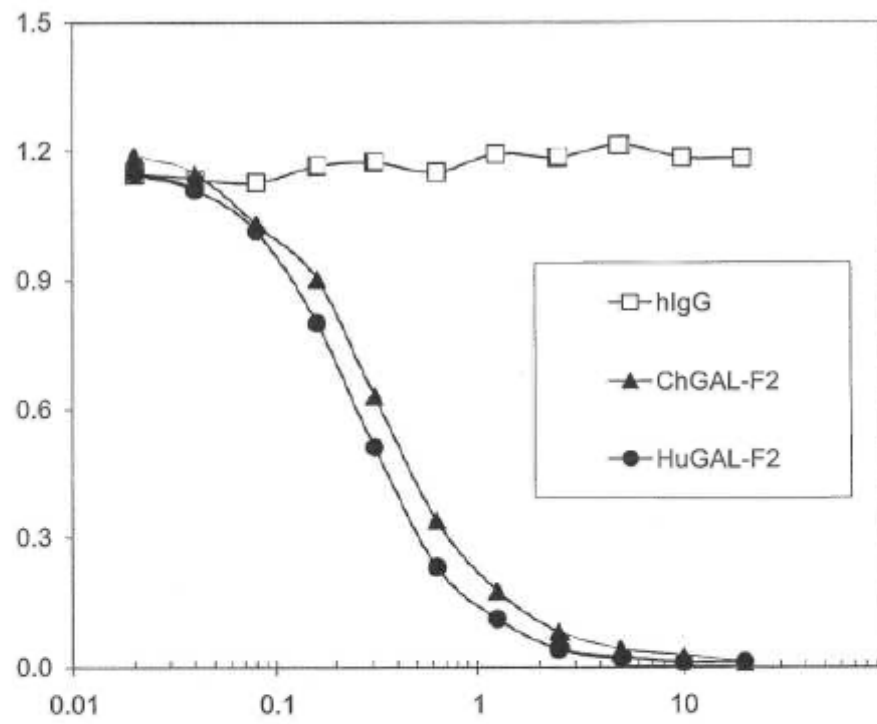


FIGURA 12

A

```

1                               D I Q M T Q S P S S
11  L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V S S D V G W Y Q Q K P
41  G K A P K L L I Y S G S N R Y S G V P S R F S G S G S G T D
71  F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q D Y Y S P W T F G Q
101 G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A
131 S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
161 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K
191 V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

```

B

```

1                               E V Q L V Q S G A E V K
13  K P G S S V K V S C K A S G Y T F T N Y V I N W V R Q A P G
43  Q G L E W I G Y N D P Y N D V S K Y N E K F K G R A T I T S
73  D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A K E G G G
103 K Y V Y A M D S W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L
133 A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
163 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
193 P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K
223 S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K
253 D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
283 V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V
313 L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K
343 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L
373 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
403 D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
433 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

```

FIGURA 13