

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 168**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 14188785 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2842573**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2**

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112686 P

30.03.2009 US 164870 P

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

12.12.2017

73 Titular/es:

GALAXY BIOTECH, LLC (100.0%)

22830 San Juan Road

Cupertino, CA 95014, US

72 Inventor/es:

KIM, KYUNG JIN;

ZHAO, WEI-MENG y

PARK, HANGIL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 646 168 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 para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2

Declaración de interés del gobierno

5 La invención descrita en esta solicitud se realizó en parte con fondos proporcionados por Grant 5R44 CA101283-03 de los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a la combinación de las tecnologías de anticuerpos monoclonales (mAb) y de ADN recombinante para el desarrollo de nuevos agentes biológicos, y más concretamente, por ejemplo, a la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a, y neutralizan el Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2.

Antecedentes de la invención

15 Existen 22 miembros conocidos de la familia del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), con un tamaño que oscila de 17 a 34 kDa y que comparten una región núcleo interna de similitud, que se pueden agrupar en 7 subfamilias basándose en su similitud de actividad y de secuencia (Ornitz et al., *Genome Biol.* 2:3005.1, 2001). Por ejemplo, el subgrupo FGF1 consiste en los FGF prototípicos, FGF1 (FGF ácido) y FGF2 (FGF básico); el subgrupo FGF4 consiste en FGF4, FGF5 y FGF6; y la subfamilia FGF7 consiste en FGF3, FGF7, FGF10 y FGF22 (Zhang et al., *J. Biol. Chem.* 281:15694, 2006).

20 Una forma de FGF2 es un polipéptido no glicosilado de 18 kDa que consiste en 146 aminoácidos derivados de un precursor de 155 aa (Ornitz et al., *Genome Biol.* 2:3005.1, 2001; Okada-Ban et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32:263, 2000). Una secuencia ilustrativa para un FGF2 de 46 aminoácidos humano se proporciona en el SEQ ID NO: 4 del documento US20020115603. A diferencia de la mayoría de los otros FGF, el FGF2 no codifica una secuencia señal para la secreción, sino que la forma de 18 kDa puede ser secretada mediante una ruta dependiente de la energía no convencional independiente del complejo RE-Golgi. El otro miembro de la subfamilia FGF1, el propio FGF1, tiene un tamaño y una estructura similares a los de FGF2 y también carece de secuencia señal pero puede ser secretado. Otro FGF de interés aquí es FGF7, también denominado factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), que es producido por las células de origen mesenquimal y estimula la proliferación de células epiteliales (Finch et al., *Adv. Cancer Res.* 91:69, 2004; Finch et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 98:812, 2006). El KGF es expresado en numerosos órganos incluyendo pulmón, próstata, mama, tracto digestivo y piel y está implicado en el desarrollo de los órganos y en la reparación de las heridas cutáneas (Cho et al., *Am. J. Pathol.* 170:1964, 2007).

35 Los miembros de la familia de FGF se unen solamente a cuatro receptores de tirosina quinasa conocidos, los Receptores del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 1-4 (FGFR1-4) y sus isoformas, uniéndose los diversos FGF a diferentes FGFR en grados variables (Zhang et al., *J. Biol. Chem.* 281:15694, 2006). Se proporciona una secuencia de proteína de FGFR2 humano, p. ej., en GenBank Locus AF487553. Cada FGFR consiste en un dominio extracelular (ECD) que comprende tres dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) (D1, D2 y D3), una única hélice transmembrana, y un dominio quinasa catalítico intracelular (Mohammadi et al., *Cytokine Growth Factor Revs.* 16:107, 2005) como se ilustra en la Fig. 1. Existe un tramo continuo de aminoácidos ácidos en el conector entre D1 y D2 denominado "caja ácida" (AB). Se cree que la región que contiene D1 y AB está implicada en la autoinhibición del receptor, que se libera mediante la unión al ligando. Los FGFR se caracterizan por múltiples empalmes alternativos de sus ARNm, que conducen a una variedad de isoformas (Ornitz et al., *J. Biol. Chem.* 271:15292, 1996; Véase también Swiss-Prot P21802 y las isoformas P21802-1 a -20 para las secuencias de FGFR2 y sus isoformas). De manera notable, existen formas que contienen los tres dominios Ig (isoforma α) o solamente los dos dominios Ig, dominios D2 y D3 sin D1 (isoforma β). De particular importancia en FGFR1 - FGFR3, mientras todas las formas contienen la primera mitad de D3 designada IIIa, se pueden utilizar dos exones alternativos para la segunda mitad de D3, conduciendo a las formas IIIb y IIIc. Para FGFR2, estos se denominan respectivamente FGFR2IIIb y FGFR2IIIc (o solamente FGFR2b y FGFR2c); las correspondientes formas beta se denominan FGFR2(beta)IIIb y FGFR2(beta)IIIc. La forma FGFR2IIIb de FGFR2 (también denominada K-sam-II {Swiss-Prot se refiere a este como K-sam-IIC1?}) (véase Swiss-Prot P21802-18) es un receptor de alta afinidad tanto para FGF1 como para KGF mientras FGFR2IIIc (también denominado K-sam-I) (véase Swiss-Prot P21820-5) se une tanto a FGF1 como a FGF2 bien pero no se une a KGF (Miki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:246, 1992). Por supuesto, FGFR2IIIb es el único receptor para KGF (Ornitz et al., 1996, op. cit.) y por lo tanto también se denomina KGFR.

55 Los FGFR y sus isoformas se expresan diferencialmente en diferentes tejidos. Notablemente, FGFR2IIIb (y las formas IIIb de FGFR1 y FGFR3) se expresan en tejidos epiteliales, mientras FGFR2IIIc se expresa en tejidos mesenquimales (Duan et al., *J. Biol. Chem.* 267:16076, 1992; Ornitz et al., 1996, op. cit.). Ciertos ligandos de FGF de estos receptores tienen un patrón de expresión opuesto. De este modo, los miembros de la subfamilia de FGF3 incluyendo FGF7 (KGF) solamente se unen a FGFR2IIIb (Zhang et al., op. cit.) y se expresan en tejidos mesenquimales de manera que pueden ser efectores paracrinos de las células epiteliales (Ornitz et al., 1996, op. cit.). En contraste, los miembros de la subfamilia de FGF4 FGF4-6 se unen a FGFR2IIIc y se expresan en linajes

tanto epiteliales como mesenquimales de manera que pueden tener funciones autocrinas o paracrinas. Debido a los patrones de expresión de las isoformas de FGFR2 y sus ligandos, FGFR2 juega un papel en las interacciones epiteliales-mesenquimales (Finch et al., *Dev. Dyn.* 203:223, 1995), de manera que no es sorprendente que la inactivación de FGFR2IIIb en ratones conduzca a graves defectos embrionarios y letalidad (De Moerloose et al., *Development* 127:483, 2000).

Además de unirse a FGFR1-4 con una elevada afinidad, los FGF se unen a proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG) con una baja afinidad. De hecho, la unión de FGF a heparina/sulfato de heparina (HS) sobre la superficie celular es necesaria para la señalización a través de los FGFR. La interacción de FGF, especialmente FGF2, con FGFR y heparina ha sido ampliamente estudiada mediante cristalografía de rayos X y análisis mutacional, y ahora se cree que la heparina/HS participa en la formación de un dímero FGF-FGFR 2:2 simétrico (Mohammadi et al., 2005), que conduce a la activación del receptor, la autofosforilación y la transducción de la señal.

Los FGF median una variedad de respuestas en diferentes tipos de células incluyendo la proliferación, migración y diferenciación, especialmente durante el desarrollo embrionario (Ornitz et al., op. cit.), y en el adulto están implicadas en la homeostasis y la reparación de tejidos. Por ejemplo, FGF2 estimula la proliferación de (esto es, es mitogénico para) ciertas células incluyendo fibroblastos y células endoteliales y es un factor de supervivencia anti-apoptótico para ciertas células tales como células neurales (Okada-Ban, op. cit.). El FGF2 también estimula la diferenciación (morfogénesis) y la migración (motilidad) de células endoteliales (Dow et al., *Urology* 55:800, 2000). Varios FGF, especialmente FGF1 y FGF2, son potentes factores angiogénicos (Presta et al., *Cytokine and Growth Factor Rev.* 16:159, 2005).

La importancia del sistema FGF en el desarrollo ha sido destacada por el descubrimiento de numerosas mutaciones en los FGFR1-3 asociados con trastornos esqueléticos congénitos humanos incluyendo el síndrome de craniosinostosis (fusión prematura de las suturas craneales) (Wilkie et al., *Cytokine Growth Factor Revs* 16:187, 2005). Estas enfermedades genéticas son normalmente dominantes debido a que las mutaciones asociadas conducen a una ganancia de función, a menudo facilitando la dimerización del receptor. Notablemente, el trastorno de craniosinostosis grave con síndrome de Apert (AS) está asociado con una de dos mutaciones (Ser-252 -> Trp o Pro-253 -> Arg) en la región conectora D2-D3 conservada de FGFR2 que incrementan la afinidad de unión al ligando (Ibrahimi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98:7182, 2001).

Se ha informado de que FGF2 y otros FGF juegan un papel en el cáncer, tanto estimulando la angiogénesis como las células tumorales directamente (Grose et al., *Cytokine Growth Factor Revs.* 16:179, 2005; Presta et al., op. cit.). El ARN de FGFR2IIIb es expresado en muchos tipos de tumores (Finch et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 98:812, 2006), a menudo como consecuencia de su expresión en los correspondientes tejidos normales (Orr-Urtreger et al., *Dev. Biol.* 158:475, 1993). El KGF (FGF7) y el KGFR (FGFR2IIIb) son expresados en exceso en muchos cánceres pancreáticos (Ishiwata et al., *Am. J. Pathol.* 153: 213, 1998), y su expresión simultánea se corresponde con una mala prognosis (Cho et al., *Am. J. Pathol.* 170:1964, 2007). Las mutaciones somáticas del gen FGFR2 se encontraron en 12% de un gran panel de carcinomas endometriales (uterinos), y en varios casos sometidos a ensayo eran requeridas para la supervivencia de las células tumorales (Dutt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:8713, 2008). En dos tumores se encontró que la mutación de FGFR2 era la misma sustitución S252W asociada con el síndrome de Apert. La amplificación y la expresión en exceso de FGFR2 están fuertemente asociadas con el tipo de cáncer gástrico difuso, indiferenciado, que tiene una prognosis particularmente mala, y la inhibición de la actividad de FGFR2 por compuestos de molécula pequeña inhibían potentemente la proliferación de tales células cancerosas (Kunii et al., *Cancer Res.* 68:2340, 2008; Nakamura et al., *Gastroenterol.* 131:1530, 2006). El ARN de FGFR2IIIb se expresaba en 16/20 cánceres epiteliales de ovario (EOC) pero no en epitelio de la superficie ovárica normal (Steele et al., *Oncogene* 20:5878, 2001); y los ligandos de FGFR2IIIb FGF1, FGF7 y FGF10 indujeron la proliferación, motilidad y protección frente a la muerte celular en líneas celulares de EOC (Steele et al., *Growth Factors* 24:45, 2006), sugiriendo que FGFR2IIIb puede contribuir al fenotipo maligno en el cáncer de ovario.

Solamente se ha informado de un número limitado de anticuerpos monoclonales para FGFR2. Fortin et al. (*J. Neurosci.* 25:7470, 2005) informaron sobre un anticuerpo de bloqueo para FGFR2, y Wei et al. (*Hybridoma* 25: 115, 2006) desarrollaron dos mAb específicos para la forma IIIb de FGFR2 (esto es, KGFR) que inhibían la proliferación celular inducida por KGF. Hestir et al. (US2007/248605, 2007) comenta anticuerpos que se unen al dominio Ig3 de FGFR2. Yayon et al. (Documento WO2007/144893, 2006) describen un mAb inhibitor que se une tanto a FGFR2 como a FGFR3. R&D Systems ha comercializado desde 2005 un mAb anti-FGFR2 que neutraliza la actividad en su análisis, con preferencia para la forma IIIb. Sin embargo, no ha habido informes sobre la actividad anti-tumoral de anticuerpos contra FGFR2 in vivo.

Compendio de la invención

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) que inhibe el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón. El mAb puede inhibir al menos una, y preferiblemente varias o todas las actividades biológicas del receptor, incluyendo la unión al receptor por FGF2. El mAb se puede unir a cualquiera o a ambas formas FGFR2IIIb y FGFR2IIIc del receptor, p. ej., a FGFR2IIIb pero no a FGFR2IIIc. Preferiblemente, el mAb de la invención está manipulado genéticamente, por ejemplo, quimérico, humanizado o humano. Los anticuerpos ilustrativos son GAL-FR21, GAL-

FR22, y GAL-FR23 y sus formas quiméricas y humanizadas, y los mAb que tienen el mismo epítipo o compiten por la unión con uno de estos mAb. En otra realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-FGFR2 manipulado genéticamente, p. ej., GAL-FR21, GAL-FR22, y GAL-FR23 quiméricos o humanizados. En una tercera realización la composición farmacéutica se administra a un paciente para tratar el

5
 Los anticuerpos humanizados ilustrados comprenden una cadena ligera humanizada que comprende CDR de la secuencia de la Fig. 13A (GAL-FR21) y una cadena pesada humanizada que comprende CDR de la secuencia de la Fig. 13B (GAL-FR21), o comprende una cadena ligera humanizada que comprende CDR de la secuencia de la Fig. 16A (GAL-FR22) y una cadena pesada humanizada que comprende CDR de la secuencia de la Fig. 16B (GAL-FR22). Algunos anticuerpos humanizados comprenden las tres CDR de la cadena ligera mostrada en la Fig. 13A (GAL-FR21) y las tres CDR de la cadena pesada mostrada en la Fig. 13B (GAL-FR21), o comprenden las tres CDR de la cadena ligera mostradas en la Fig. 16A (GAL-FR22) y las tres CDR de la cadena pesada mostradas en la Fig. 16B (GAL-FR22). Opcionalmente, la región variable de la cadena ligera tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con la secuencia mostrada en la Fig. 13A (HuGAL-FR21) y la región variable de la cadena pesada tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con la secuencia mostrada en la Fig. 13B (HuGAL-FR21). En algunos de tales anticuerpos, los residuos H27, H28, H30, H48, y H67 por la numeración de Kabat están ocupados por el residuo que ocupa la correspondiente posición de la cadena pesada mostrada en la Fig. 13B (GAL-FR21). Un anticuerpo humanizado preferido comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia mostrada en la Fig. 13A (HuGAL-FR21) y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia mostrada en la Fig. 13B (HuGAL-FR21).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diagrama esquemático de la estructura de FGFR2, que muestra los tres dominios de tipo Ig (D1, D2 y D3), el dominio transmembrana (caja negra), y el dominio quinasa intracelular. Se indican el sitio de unión a heparina (HBS), la caja ácida (AB) y los dominios parciales IIIb/IIIc alternativos. N = extremo amino, C = extremo carboxi.

25 Figura 2. Compendio de las propiedades de los mAb anti-FGFR2 GAL-FR21, GAL-FR22, GAL-FR23 descritos en Ejemplos.

Figura 3. ELISA de unión de los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 y mIgG de control negativo para FGFR2IIIb.

30 Figura 4. ELISA de unión de los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 y mAb de ratón de control negativo 5G8 para cada una de las cuatro formas de FGFR2-FGFR2IIIb, FGFR2(beta)IIIb, FGFR2(IIIc) y FGFR2(beta)IIIc - como proteínas de fusión con Fc. Se utilizó una concentración fija de cada mAb en el análisis.

Figura 5. ELISA de unión competitiva para FGFR2IIIb de cada uno de los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 y mAb de ratón de control negativo 5G8 contra los mAb en forma biotinilada. Se utilizó una razón 100:1 de mAb no marcado con respecto a biotinilado.

35 Figura 6. Citometría de flujo de la unión de los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 y mAb de control negativo para FGFR2IIIb sobre células SNU-16 y KATO III.

Figura 7. Citometría de flujo de la unión de los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 y el mAb de control negativo a células 293F transfectadas con FGFR2IIIc o FGFR2IIIb(S252W).

40 Figura 8. (A) Análisis ELISA que mide la inhibición de la unión de FGF1 (panel superior) y FGF2 (panel inferior) a FGFR2IIIb por los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23. (B) Análisis ELISA que mide la inhibición de la unión de FGF7 (panel superior) y FGF10 (panel inferior) a FGFR2IIIb por los mAb GAL-FR21 y GAL-FR22.

Figura 9. Crecimiento de xenoinjertos de tumor gástrico humano SNU-16 en ratones tratados con PBS solo, GAL-FR21, GAL-FR23 o FR2bC 54.8.11 (panel superior) o con PBS, GAL-FR22 o FR2bC 54.8.11 (panel inferior). Los mAb se administraron a 20 µg dos veces por semana, aproximadamente 5 ratones por grupo.

45 Figura 10. Crecimiento de xenoinjertos de tumor gástrico humano SNU-16 (A, panel superior) u OCUM-2M (B, panel inferior) en ratones tratados con PBS solo, GAL-FR21 o GAL-FR22.

Figura 11. Elisa de unión de GAL-FR21 (panel superior) o GAL-FR22 (panel inferior) a FGFR2IIIb humano y de ratón.

50 Figura 12. ELISA de unión de GAL-FR21 (panel superior) o GAL-FR22 (panel inferior) a FGFR2IIIb humano y de mono cinomolgo.

Figura 13. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables maduras de la cadena ligera (A) y la cadena pesada (B) de HuGAL-FR21 se muestran alineadas con regiones Vceptoras de GAL-FR21 de ratón y humanas. Las CDR están subrayadas en las secuencias de GAL-FR21, y los aminoácidos sustituidos por aminoácidos de

ratón están doblemente subrayados en las secuencias de HuGAL-FR21. Se utilizan el código de aminoácidos de 1 letra y el sistema de numeración de Kabat para la cadena tanto ligera como pesada.

Figura 14. Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (A) y la cadena pesada (B) del anticuerpo HuGAL-FR21 maduro completo. El primer aminoácido de cada línea está numerado; la numeración es secuencial. En la cadena ligera, el primer aminoácido de la región C_k está subrayado, y en la cadena pesada, los primeros aminoácidos de las regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3 están subrayados.

Figura 15. Unión competitiva de mAb HuGAL-FR21 humanizado y GAL-FR21 de ratón y anticuerpo hIgG humano de control, llevada a cabo como se describe en la memoria.

Figura 16. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables maduras de la cadena ligera (A) y la cadena pesada (B) de HuGAL-FR22, con las CDR subrayadas. Se utilizan el código de aminoácidos de 1 letra y el sistema de numeración de Kabat para la cadena tanto ligera como pesada.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención proporciona anticuerpos monoclonales (mAb) anti-FGFR2 que inhiben las actividades biológicas de FGFR2 y/o inhiben el crecimiento de un xenoinjerto de tumor que expresa FGFR2 en un ratón, composiciones farmacéuticas que comprenden los mAb, y métodos de utilización de las mismas para el tratamiento de enfermedades.

1. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas complejas, muy grandes (peso molecular de ~150.000 o aproximadamente 1320 aminoácidos) con una 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 consiste a su vez en dos regiones: una región variable ("V") implicada en la unión del antígeno diana, y una región constante ("C") que interacciona con otros componentes del sistema inmunitario. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada están juntas en el espacio tridimensional para formar una región variable que se une al antígeno (por ejemplo, un receptor sobre la superficie de una célula). Dentro de cada región variable de la cadena ligera o pesada, existen tres segmentos cortos (con un promedio de 10 aminoácidos de longitud) denominados regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"). Las seis CDR de un dominio variable de anticuerpo (tres de la cadena ligera y tres de la cadena pesada) se pliegan juntas en el espacio tridimensional para formar el sitio de unión del anticuerpo real que se cierra sobre el antígeno diana. La posición y la longitud de las CDR han sido definidas con precisión por Kabat, E. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987. La parte de una región variable no contenida en las CDR se denomina marco, que forma el entorno para las CDR.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo manipulado genéticamente en el que las CDR de un anticuerpo de ratón ("anticuerpo donador", que también puede ser de rata, hámster u otra especie no humana) son injertadas sobre un anticuerpo humano ("anticuerpo aceptor"). La secuencia del anticuerpo aceptor puede ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano maduro, una secuencia consenso de secuencias de anticuerpos humanos, o una secuencia de la región de la línea germinal. De este modo, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene CDR de un anticuerpo donador y un marco de la región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano. Además, con el fin de conservar la elevada afinidad de unión, se puede emplear al menos uno de dos elementos estructurales adicionales. Véanse, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.530.101 y 5.585.089, que proporcionan instrucciones detalladas para la construcción de anticuerpos humanizados. Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (preferiblemente como define Kabat, pero alternativamente por otras definiciones, tales como la de Chothia) de un anticuerpo de ratón, también se pueden elaborar con menos que las CDR completas de un anticuerpo de ratón (p. ej., Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002); Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, (2002); Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, (2000).

De un modo similar, puede ser necesario incorporar solamente parte de las CDR, a saber el subgrupo de residuos de las CDR requerido para la unión, denominados SDR, al anticuerpo humanizado. Los residuos de la CDR que no contactan con el antígeno y que no están en los SDR se pueden identificar basándose en estudios previos (por ejemplo los residuos H60-H65 de CDRH2 a menudo no son necesarios), de regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), mediante modelado molecular y/o empíricamente, o como describen Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. En tales anticuerpos humanizados en las posiciones en las que uno o más residuos de la CDR del donando están ausentes, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la correspondiente posición (por la numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de tales sustituciones que se van a incluir refleja un equilibrio de consideraciones contradictorias. Tales sustituciones son potencialmente ventajosas al disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, por consiguiente, al disminuir la inmunogenicidad potencial. No obstante, las sustituciones también pueden ocasionar cambios de afinidad, y

preferiblemente se evitan las reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución en las CDR y los aminoácidos a sustituir también se pueden seleccionar empíricamente.

De este modo, típicamente un anticuerpo humanizado comprende (i) una cadena ligera que comprende CDR (a menudo tres CDR) de un anticuerpo de ratón, p. ej., GAL-FR21, un marco de la región variable humana, y una región constante humana; y (ii) una cadena pesada que comprende CDR (a menudo tres CDR) del anticuerpo de ratón, p. ej., GAL-FR21, un marco de la región variable humana, y una región constante humana. Los marcos de la región variable de la cadena ligera y pesada pueden ser cada uno una secuencia de anticuerpo humano maduro, una secuencia consenso de secuencias de anticuerpos humanos, o una secuencia de una región de la línea germinal.

10 En el primer elemento estructural, el marco de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado se selecciona para que tenga una identidad de secuencia máxima (entre 65% y 95%) con el marco de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo donador, mediante la selección adecuada del anticuerpo aceptor entre los muchos anticuerpos humanos conocidos. En el segundo elemento estructural, al construir el anticuerpo humanizado, los aminoácidos seleccionados del marco del anticuerpo aceptor humano (fuera de las CDR) se reemplazan por los correspondientes aminoácidos del anticuerpo donador, de acuerdo con reglas especificadas. Específicamente, los aminoácidos que se van a reemplazar en el marco se seleccionan basándose en su capacidad para interactuar con las CDR. Por ejemplo, los aminoácidos reemplazados pueden ser adyacentes a una CDR de la secuencia del anticuerpo donador o estar a 4-6 angstroms de una CDR del anticuerpo humanizado según se mide en el espacio tridimensional.

20 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 por medio de manipulación genética es bien conocida. Tales anticuerpos conservan la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, a la vez que es aproximadamente dos tercios humano. La proporción de secuencia no humana presente en los anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados sugiere que la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos es intermedia entre la de los anticuerpos de ratón y humanizados. Otros tipos de anticuerpos manipulados genéticamente que pueden tener una inmunogenicidad reducida con respecto a los anticuerpos de ratón incluyen anticuerpos humanos elaborados utilizando métodos de presentación en fagos (Dower et al., documento WO91/17271; 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; Kucherlapati documento WO91/10741).

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término anticuerpo "de tipo humano" hace referencia a un mAb en el que una porción sustancial de la secuencia de aminoácidos de una o ambas cadenas (p. ej., 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. Según se utiliza en la presente memoria, un mAb con "inmunogenicidad reducida" es aquel que se espera que tenga significativamente menos inmunogenicidad que un anticuerpo de ratón cuando se administra a pacientes humanos. Tales anticuerpos incluyen mAb quiméricos, humanizados y humanos así como mAb elaborados reemplazando aminoácidos específicos en los anticuerpos de ratón que pueden contribuir a epítomos de las células B o T, por ejemplo residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). Según se utiliza en la presente memoria, un mAb "manipulado genéticamente" es aquél para el cual se han construido los genes o se ha colocado en un entorno no natural (p. ej., genes humanos en un ratón o un bacteriófago) con la ayuda de técnicas de ADN recombinante, y por lo tanto no incluiría, p. ej., un mAb de ratón elaborado con tecnología de hibridoma convencional.

También se podrían utilizar otros enfoques para diseñar anticuerpos humanizados para lograr el mismo resultado que los métodos de la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.530.101 y 5.585.089 descritas anteriormente, por ejemplo, "superhumanización" (véanse Tan et al. J. Immunol. 169: 1119, 2002, y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.881.557) o el método de Studnicak et al., Protein Eng. 7:805, 1994. Por otra parte, otros enfoques para producir mAb con inmunogenicidad reducida, manipulados genéticamente incluyen "remodelación", "hiperquimerización" y acondicionamiento de la superficie ("veneering/resurfacing"), como se describe, p. ej., en Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma and Immunology 81:105, 1998; Roguska et al. Protein Eng. 9:895, 1996; y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.072.035 y 5.639.641.

50 El epítomo de un mAb es la región de su antígeno a la cual se une el mAb. Dos anticuerpos se unen al mismo epítomo o a un epítomo solapante si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro al antígeno. Esto es, un exceso de 1x, 5x, 10x, 20x o 100x de un anticuerpo inhibe la unión del otro al menos en 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o incluso 99% según se mide en un análisis de unión competitiva (véase, p. ej., Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítomo 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 epítomos solapantes si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo, reducen o eliminan la unión del otro.

2. Anticuerpos anti-FGFR2

Se dice que un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une a FGFR2 (esto es, un mAb anti-FGFR2) neutraliza FGFR2, o es neutralizador (o inhibidor o antagonista), si la unión inhibe parcialmente o completamente una o más actividades biológicas de FGFR2. Entre las actividades biológicas de FGFR2 que puede inhibir o bloquear un anticuerpo neutralizador se encuentra la capacidad de FGFR2 para unirse a uno o más o todos sus ligandos FGF, p. ej. FGF1 y/o FGF2. Para FGFRIIIb estos ligandos incluyen FGF1, FGF7 (KGF) y los otros miembros de la subfamilia de FGF7, FGF3, FGF10 y FGF22. Para FGFRIIIc estos ligandos incluyen FGF1 y FGF2; FGF4 y los otros miembros de la subfamilia de FGF4, FGF5 y FGF6; FGF8 y los otros miembros de la subfamilia de FGF8, FGF17 y FGF18; y FGF9 y los otros miembros de la subfamilia de FGF9, FGF16 y FGF20. Otra actividad importante de FGFR2 que puede ser inhibida por un mAb anti-FGFR2 neutralizador es la estimulación de la proliferación de células, p. ej., células epiteliales o endoteliales, fibroblastos, células tales como células Ba/F3 en las cuales se ha transfectado FGFR2, y diversas células tumorales humanas. Otras actividades inhibibles por un mAb anti-FGFR2 neutralizador son la estimulación de la diferenciación y migración de células tales como células endoteliales, y la inducción de angiogénesis, por ejemplo como se mide mediante estimulación de la proliferación de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) o la formación de tubo o mediante la inducción de vasos sanguíneos cuando se aplica a membrana corioalantoica (CAM) de embrión de pollo. Normalmente, el mAb neutralizador inhibe estas actividades cuando es inducido por uno o más de los FGF enumerados anteriormente. De un modo similar, el mAb inhibe preferiblemente toda o parte de la ruta de transducción de la señal estimulada por la unión de un ligando FGF a FGFR2 (Dailey et al., Cytokine Growth Factor Revs 16:233, 2005), p. ej., fosforilación de FGFR2 y MAP quinasas aguas abajo.

Un mAb neutralizador de la invención a una concentración, p. ej., de 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 o 50 g/ml inhibe una función biológica de FGFR2 aproximadamente al menos 50% pero preferiblemente 75%, más preferiblemente 90% o 95% o incluso 99%, y muy preferiblemente aproximadamente 100% (esencialmente completamente o sin distinción de un control negativo que carece de FGFR2) analizada mediante métodos descritos en el apartado Ejemplos o conocidos en la técnica. Típicamente, el grado de inhibición se mide cuando la cantidad de ligando FGF utilizada es suficiente para estimular completamente la actividad biológica, o es 1, 2, o 5 ng/ml o 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 3 o 10 g/ml. Preferiblemente, el mAb es neutralizador, esto es, inhibe la actividad biológica, cuando se utiliza como un único agente, pero opcionalmente se pueden utilizar 2 mAbs juntos para proporcionar la inhibición. Muy preferiblemente, el mAb neutraliza no solo una sino dos, tres o varias de las actividades biológicas enumeradas más arriba; para los fines de la presente memoria, un mAb anti-FGFR2 que utiliza un único agente que neutraliza todas las actividades biológicas de FGFR2 se denomina "completamente neutralizador", y tales mAb son los más preferibles.

La descripción proporciona mAb neutralizadores que se unen a FGFR2IIIb pero se unen peor o de manera no detectable a FGFR2IIIc, o alternativamente se unen a FGFR2IIIc pero peor o de manera no detectable a FGFR2IIIb, o una tercera alternativa se une tanto a FGFR2IIIb como a FGFR2IIIc, y el uso de cualquiera de estos tipos de anticuerpos en una composición farmacéutica, especialmente para el tratamiento del cáncer u otras enfermedades. La descripción también proporciona mAb, neutralizadores o no neutralizadores, que se unen a FGFR2 en una o más de sus formas e inhiben, preferiblemente por completo, el crecimiento de un xenoinjerto de tumor que expresa FGFR2, p. ej., un xenoinjerto SNU-16 u OCUM-2M. Semejante mAb puede inhibir el crecimiento tumoral, p. ej., transmitiendo una señal de crecimiento negativa o una señal pro-apoptótica a través de FGFR2. Los mAb descritos en la presente memoria son preferiblemente específicos para FGFR2 o se unen a él preferentemente, esto es, no se unen, o solamente se unen en un grado mucho menor (p. ej., al menos 10 veces menos), a proteínas relacionadas con FGFR2 tales como otros receptores de FGF, FGFR1, FGFR3 y FGFR4 así como a otras tirosina quinasas receptoras de membrana. Por otra parte, en algunos casos, se prefieren los mAb que se unen a uno o más de los otros receptores de FGF además de a FGFR2. Los mAb descritos en la presente memoria tienen típicamente una afinidad de unión (constante de asociación K_a) para FGFR2 de al menos $10^7 M^{-1}$ pero preferiblemente $10^8 M^{-1}$ o superior, y muy preferiblemente $10^9 M^{-1}$ o superior o incluso $10^{10} M^{-1}$ o superior. Los mAb que muestran una unión diferencial o preferencial a una forma de FGFR o FGFR2 sobre otra, muestran preferiblemente una preferencia de al menos cinco, diez o cien veces entre las formas, p. ej., medida por medio de K_a . La carencia de unión entre un anticuerpo y un antígeno (esto es, el anticuerpo no se une al antígeno) significa que cualquier señal de una reacción de unión intentada entre los dos es indistinguible de un control negativo, p. ej., en el que el anticuerpo o el antígeno están ausentes o han sido remplazados por un agente inactivo.

Algunos mAb descritos en la presente memoria se unen tanto a FGFR2 humano como a FGFR2 de ratón, o se unen a FGFR2 humano y a uno, dos o más de todos los FGFR2 de ratón, rata, conejo, pollo, perro y/o mono (p. ej., mono cinomolgo). En algunos casos, el mAb se une a FGFR2 de ratón (p. ej., FGFR2IIIb de ratón) con una afinidad (esto es, K_a) de 2, 10 o 100 veces la afinidad por el FGFR2 humano; de un modo similar el mAb se puede unir a FGFR2 de mono cinomolgo y/o chimpancé (p. ej., FGFR2IIIb) con una afinidad de 2 o 10 veces la afinidad por el FGFR2 humano o incluso sustancialmente la misma o sin distinción de la unión a FGFR2 humano (esto es, dentro del error experimental). Otros mAb son específicos solo para FGFR2 humano.

Los mAb de la invención incluyen anticuerpos anti-FGFR2 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, esto es, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas e IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3 de ratón. Los mAb de la invención también

incluyen fragmentos de anticuerpos tales como Fv, Fab y F(ab')₂; anticuerpos híbridos bifuncionales (p. ej., 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 (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821). Los mAb pueden ser de origen animal (p. ej., ratón, rata, hámster o pollo), o pueden estar manipulados genéticamente. Los mAb de roedor se elaboran mediante métodos convencionales, que comprenden inmunización múltiple con FGFR2 en un coadyuvante apropiado i.p., i.v., o en la almohadilla plantar, seguido de extracción de células del bazo o de ganglio linfático y fusión con una línea celular inmortalizada adecuada, y a continuación selección para determinar los hibridomas que producen anticuerpo que se une a FGFR2, p. ej., véase en los Ejemplos más abajo. Los mAb quiméricos y humanizados, elaborados mediante métodos conocidos en la técnica mencionados más arriba, son realizaciones preferidas de la invención. También se prefieren los anticuerpos humanos elaborados, p. ej., mediante presentación en fagos o métodos con ratones transgénicos (véanse, p. ej., Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, más arriba).

Los mAb anti-FGFR2 GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 se describen a continuación. Una vez que se ha aislado un mAb anti-FGFR2 arquetípico, individual, por ejemplo GAL-FR21, que tiene las propiedades deseadas descritas en la presente memoria de neutralización de FGFR2, es sencillo generar otros mAb con propiedades similares, p. ej., que tengan el mismo epítipo, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden inmunizar ratones con FGFR2 como se ha descrito anteriormente, producir hibridomas, y escrutar los mAb resultantes para determinar la capacidad para competir con el mAb arquetípico por la unión a FGFR2. Los ratones también pueden ser inmunizados con un fragmento más pequeño de FGFR2 que contiene el epítipo al cual se une el mAb arquetípico. El epítipo puede ser localizado, p. ej., escrutando para determinar la unión a una serie de péptidos solapantes que abarcan FGFR2. Alternativamente, se puede utilizar el método de Jaspers et al., Biotechnology 12:899, 1994 para guiar la selección de mAb que tienen el mismo epítipo y por lo tanto propiedades similares a las del mAb arquetípico, p. ej., GAL-FR21. Utilizando la presentación en fagos, primero la cadena pesada del anticuerpo arquetípico se empareja con un repertorio de cadenas ligeras (preferiblemente humanas) para seleccionar un mAb que se una a FGFR2, y a continuación la nueva cadena ligera se empareja con un repertorio de cadenas pesadas (preferiblemente humanas) para seleccionar un mAb que se una a FGFR2 que tenga el mismo epítipo que el mAb arquetípico. Alternativamente se pueden obtener variantes, p. ej., de GAL-FR21 mediante mutagénesis de ADNc que codifica las cadenas pesada y ligera de GAL-FR21.

Los mAbs con el mismo epítipo o un epítipo solapante con GAL-FR21, GAL-FG22 o GAL-FR23, p. ej., que compiten por la unión a FGFR2 con el respectivo mAb, proporcionan otro ejemplo. Una forma quimérica o humanizada de GAL-FR21, GAL-FG22 o GAL-FR23 es un ejemplo especialmente preferido. También se describen en la presente memoria mAb que son idénticos en 90%, 95% o 99% a GAL-FR21, GAL-FG22 o GAL-FR23 en una secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera (sin incluir la secuencia señal) y mantienen sus propiedades funcionales, y/o difieren del respectivo mAb en un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente irrelevantes (p. ej., sustituciones conservativas), deleciones, o inserciones. También se describen mAb que tienen al menos una y preferiblemente las seis CDR que son idénticas en 90%, 95% o 99% o 100% a las correspondientes CDR de GAL-FR21, GAL-FG22 o GAL-FR23. Aquí, como en otros lugares de esta solicitud, todos los porcentajes de identidad se determinan con secuencias de anticuerpos máximamente alineadas por medio de la convención de la numeración de Kabat. Después del alineamiento, si una región del anticuerpo sujeto (p. ej., la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se está comparando con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de los anticuerpos sujeto y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido en la región del anticuerpo tanto sujeto como de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los huecos, multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se pueden agrupar como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales alcalinas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la conformación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos del mismo grupo. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de uno de estos Grupos por un miembro de otro.

Los mAb nativos de la invención se pueden producir a partir de sus hibridomas. Los mAb manipulados genéticamente, p. ej., mAb quiméricos o humanizados, pueden ser expresados por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes que codifican las regiones V de sus cadenas ligera y pesada se pueden sintetizar a partir de oligonucleótidos solapantes e insertar junto con regiones C disponibles en vectores de expresión (p. ej., asequibles comercialmente de Invitrogen) que proporcionan las regiones reguladoras necesarias, p. ej., promotores, intensificadores, sitios poli A, etc. Se prefiere el uso del promotor-intensificador de CMV. Los vectores de expresión se pueden transfectar a continuación utilizando diversos métodos bien conocidos tales como lipofección o electroporación en una variedad de líneas celulares de mamífero tales como CHO o mielomas no productores incluyendo Sp2/0 y NSO, y células que expresan los anticuerpos seleccionados mediante selección con antibióticos apropiada. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.530.101. Se pueden producir cantidades más grandes de anticuerpo haciendo crecer las células en biorreactores disponibles en el mercado.

Una vez expresados, los mAb u otros anticuerpos de la invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica tales como microfiltración, ultrafiltración, cromatografía de afinidad con 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 con una homogeneidad de al menos aproximadamente 90 o 95% p/p, y los más preferidos con una homogeneidad de 98% o 99% p/p o más, para usos farmacéuticos.

3.- Métodos de Tratamiento

La invención proporciona métodos de tratamiento en los que el mAb de la invención (esto es, un mAb anti-FGFR2) se administra a pacientes que tienen una enfermedad (tratamiento terapéutico) o con riesgo de aparición 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 con fines de ensayo, tales como ratones y ratas. Los métodos son particularmente aptos para el tratamiento de pacientes humanos. El mAb utilizado en los métodos de tratamiento de pacientes humanos se une a la proteína FGFR2 humana, cuya secuencia es proporcionada por GenBank Locus AF487553. Las citas de otros FGFR o FGF referidos en esta descripción se proporcionan en la sección Antecedentes. También se puede utilizar un mAb para una proteína humana en otras especies en las que el homólogo de especie tiene reactividad cruzada antigénica con la proteína humana. En especies que carecen de semejante reactividad cruzada, se utiliza un anticuerpo con especificidad apropiada por el homólogo de especie presente en esa especie. No obstante, en experimentos de xenoinjerto en animales de laboratorio, se utiliza generalmente un mAb con especificidad por 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 contienen el mAb en un portador fisiológicamente aceptable, opcionalmente con excipientes o estabilizadores, en forma de soluciones liofilizadas o acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores adecuados no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, o acetato a un pH típicamente de 5,0 a 8,0, muy a menudo de 6,0 a 7,0; sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para alcanzar la isotonicidad; antioxidantes, conservantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrófilos tales como polisorbato 80, aminoácidos tales como glicina, carbohidratos, agentes quelantes, azúcares, y otros ingredientes convencionales 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 0,1 - 100 mg/ml, p. ej., 1 - 10 mg/ml o 10 - 50 mg/ml, por ejemplo 5, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 mg/ml.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de tratamiento de un paciente con una enfermedad utilizando un mAb anti-FGFR2 en una formulación farmacéutica. El mAb preparado en una formulación farmacéutica se puede administrar a un paciente mediante cualquier ruta adecuada, especialmente parenteralmente mediante infusión intravenosa o inyección en embolada, intramuscularmente o subcutáneamente. La infusión intravenosa se puede administrar a lo largo de tan poco como 15 minutos, pero más a menudo durante 30 minutos, o a lo largo de 1, 2 o incluso 3 horas. El mAb también se puede inyectar directamente en el sitio de la enfermedad (p. ej., un tumor), o encapsular en agentes portadores tales como liposomas. La dosis administrada es suficiente para aliviar al menos parcialmente la afección que está siendo tratada (dosis "terapéuticamente eficaz") y opcionalmente de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 mg/kg, pero puede ser tan alta como 0,1 o 1 a 10 mg/kg o incluso de 1 a cualquiera de 15, 20 o 30 mg/kg. También se puede administrar una dosis unitaria fija, por ejemplo, 100, 200, 500, 1000 o 2000 mg, o la dosis se puede basar en el área de superficie del paciente, p. ej., 1000 mg/m². Normalmente se administran entre 1 y 8 dosis, (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) para tratar el cáncer, pero se pueden suministrar 10, 20 o más dosis. El mAb se puede administrar diariamente, bisemanalmente, semanalmente, en semanas alternas, mensualmente o a 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. También son posibles cursos repetidos de tratamiento, como es la administración crónica.

Una combinación de una dosis, una frecuencia de administración y una ruta de administración eficaces para aliviar al menos parcialmente una enfermedad presente en un paciente que está siendo tratado es referida como régimen terapéuticamente eficaz. Una combinación de una dosis, una frecuencia de administración y una ruta de administración eficaces para inhibir o retrasar el comienzo de una enfermedad en un paciente es referida como régimen profilácticamente eficaz.

Las enfermedades especialmente susceptibles de tratamiento con los mAb anti-FGFR2 de la invención incluyen tumores sólidos que se cree que requieren angiogénesis o están asociados con niveles detectables o preferiblemente elevados de FGFR2 y/o un FGF, por ejemplo cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de pulmón (de células pequeñas o de células no pequeñas), cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cuello de útero, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado), carcinoma de células renales (cáncer de riñón), tumores de cabeza y cuello, mesotelioma, melanoma, sarcomas, y tumores cerebrales (p. ej., gliomas, tales como glioblastomas). Se pueden medir niveles elevados a nivel de proteína o ARNm en tejido canceroso en relación con niveles comparables de FGFR2 (p. ej., FGFR2IIIb) o FGF (p. ej., FGF2, FGF7 o FGF10) en relación con niveles comparables del respectivo FGFR2 o FGF en tejido

normal tal como tejido no canceroso del mismo tejido, preferiblemente del mismo paciente. De un modo similar se pueden medir niveles detectables a nivel de proteína o ARNm en tejido canceroso y compararlos con niveles de fondo en muestras de control en las cuales se sabe que el analito (p. ej., FGFR2 o FGF) está ausente o en relación con controles negativos en los cuales la detección se realiza utilizando un anticuerpo o cebador o sonda que se sabe que no se une al analito o al ácido nucleico que codifica el analito. Leucemias, linfomas, mieloma múltiple y otras malignidades hematológicas, especialmente cualquiera de estos cánceres que tenga un aumento de expresión de FGFR2 y/o FGF, también pueden ser susceptibles de tratamiento con los mAb anti-FGFR2. Otras enfermedades asociadas con la angiogénesis para las cuales el tratamiento con los mAb anti-FGFR2 de la invención son adecuados incluyen degeneración macular asociada con la edad (DMAE), retinopatía diabética, glaucoma neovascular y otras enfermedades del ojo; psoriasis y otras enfermedades de la piel; artritis reumatoide; y trastornos esqueléticos genéticos asociados con mutaciones en el FGFR2, p. ej., síndrome de Apert, como se ha descrito anteriormente.

En una realización preferida, el mAb anti-FGFR2 se administra combinado con (esto es, junto con, esto es, antes, durante o después de) otra terapia. Por ejemplo, para tratar el cáncer, se puede administrar el mAb anti-FGFR2 junto con uno cualquiera 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 y antibióticos de plantas tales como bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina, etoposido, 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 obleas de temozolomida y Gliadel® que contienen carmustina; e inhibidores de tirosina quinasa tales como Gleevec®, Sutent® (sunitinib malato), Nexavar® (sorafenib) y Tarceva® (erlotinib) o Iressa® (gefitinib); inhibidores de la angiogénesis; y todos los agentes anti-cancerosos aprobados y experimentales enumerados en el documento WO 2005/017107 A2. El mAb anti-FGFR2 se puede utilizar combinado con 1, 2, 3 o más de estos otros agentes utilizados en un régimen quimioterapéutico convencional. Normalmente, los otros agentes son aquellos ya conocidos por ser eficaces para el tipo concreto de cáncer que se esté tratando. El mAb anti-FGFR2 es especialmente útil para superar la resistencia a fármacos quimioterapéuticos y aumentar de ese modo su eficacia.

Otros agentes con los cuales se puede administrar el mAb anti-FGFR2 para tratar el cáncer incluyen agentes biológicos tales como anticuerpos monoclonales, incluyendo Herceptin™ contra el antígeno HER2; Avastin® contra VEGF; o anticuerpos para 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-FGFR2, incluyendo el mAb L2G7 (Kim et al., Clin Cancer Res 12:1292, 2006 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.220.410) y concretamente sus formas quiméricas y humanizadas tales como HuL2G7 (documento WO 07115049 A2); los mAb anti-HGF humano descritos en el documento WO 2005/017107 A2, concretamente 2.12.1; y las proteínas de unión a HGF descritas en el documento WO 07143090 A2 o el documento WO 07143098 A2; y otros mAb anti-HGF neutralizadores que compiten por la unión con cualquiera de los mAbs 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 manipulado genéticamente para que tenga solamente un "brazo", esto es el dominio de unión. Los anticuerpos contra los otros receptores FGFR FGFR1, 3, 4 o contra varios FGF tales como FGF1, FGF2 y FGF7 también se prefieren para su uso combinado con el mAb anti-FGFR2. Por otra parte, se puede utilizar el mAb anti-FGFR2 junto con cualquier forma de cirugía y/o terapia de radiación incluyendo radiación externa, terapia con radiación de intensidad modulada (IMRT) y cualquier forma de radiocirugía tal como, p. ej., Gamma Knife.

El tratamiento (p. ej., quimioterapia convencional) que incluye el anticuerpo mAb anti-FGFR2 puede aliviar una enfermedad incrementando el tiempo de supervivencia libre de progreso medio o de supervivencia global de pacientes con cáncer al menos 30% o 40% pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o incluso 100% o más, en comparación con el mismo tratamiento (p. ej., quimioterapia) pero sin el mAb anti-FGFR2. Además o alternativamente, el tratamiento (p. ej., quimioterapia convencional) que incluye el mAb anti-FGFR2 puede incrementar la tasa de respuesta completa, la tasa de respuesta parcial, o la tasa de respuesta objetivo (completa + parcial) de pacientes con estos tumores (p. ej., de ovario, de endometrio, de páncreas, de mama, de pulmón, de colon y glioblastomas especialmente cuando es recidivante o refractario) al menos 30% o 40% pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o incluso 100% en comparación con el mismo tratamiento (p. ej., quimioterapia) pero sin el mAb anti-FGFR2.

Típicamente, en una prueba clínica (p. ej., una prueba en fase II, fase II/III o fase III), los incrementos anteriormente mencionados en la supervivencia libre de progreso media y/o la tasa de respuesta de los pacientes tratados con quimioterapia más el mAb anti-FGFR2, con respecto al Grupo de control de pacientes que reciben quimioterapia solamente (o más placebo), son estadísticamente diferentes, por ejemplo a un nivel de $p = 0,05$ o $0,01$ o incluso $0,001$. Las tasas de respuesta completa y parcial se determinan por medio de criterios objetivos comúnmente utilizados en pruebas clínicas para el cáncer, p. ej., como los enumerados o aceptados por el Instituto Nacional del Cáncer y/o la Administración de Alimentos y Fármacos.

4. Otros métodos

Los mAb anti-FGFR2 de la invención también encuentran uso en métodos de diagnóstico, pronóstico y de laboratorio. Se pueden utilizar para medir el nivel de FGFR2 en un tumor o en la circulación de un paciente con un tumor, y por lo tanto para seguir y guiar el tratamiento del tumor. Por ejemplo, un tumor asociado con niveles elevados de FGFR2 (p. ej., incrementado con respecto a una muestra no cancerosa del mismo tejido del mismo paciente) es especialmente susceptible de tratamiento con un mAb anti-FGFR2. En realizaciones particulares, se pueden utilizar los mAb en un ELISA o un radioinmunoanálisis para medir el nivel de FGFR2, p. ej., en suero, o en inmunohistoquímica para localizar la expresión de FGFR2, p. ej., en un espécimen de biopsia de tumor. El uso de dos mAb anti-FGFR2 que se unen a diferentes epítomos (esto es, que no compiten por la unión) es especialmente útil en el desarrollo de un ELISA "sándwich" sensible para detectar el FGFR2. Para diversos análisis, el mAb puede estar marcado con moléculas fluorescentes, moléculas con marca de espín, enzimas o radioisótopos, y puede ser proporcionado en forma de kit con todos los reactivos necesarios para realizar el análisis para FGFR2. En otros usos, se utilizan los mAb anti-FGFR2 para purificar FGFR2, p. ej., mediante cromatografía de afinidad.

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Reactivos y análisis

Preparación de Flag-FGF1, FLAG-FGF2, y FLAG-FGF7. Las secuencias de ADN para el FGF1 humano (la forma con 155 aminoácidos; Chiu et al., *Oncogene* 5:755-1990) y el FGF2 humano (la forma con 155 aminoácidos; Sommer et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 144:543, 1987) se sintetizaron (GenScript, Inc), a continuación se amplificaron mediante PCR para tener un péptido Flag N-terminal y se clonaron en un derivado del vector pET (Invitrogen) utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Estos plásmidos se transformaron en células de *E. coli* BL21 (DE3) y se indujo la expresión de FGF1 o FGF2 utilizando IPTG 1 mM. El nivel de expresión de FGF se determinó utilizando un kit de ELISA específico para FGF1 o FGF2 (R&D Systems). El FGF se purificó utilizando cuentas de heparina-Sefarosa CL-6B (Amersham Biosciences) como se describe (Wiedlocha et al., *Mol. Cell. Biol.* 16:270, 1996). De un modo similar, se sintetizó un gen para FGF7 humano (la forma precursora con 194 aminoácidos; Finch, P.W. et al., *Science* 245:752, 1989) y se amplificó mediante PCR para tener una etiqueta Flag N-terminal en un vector pCMV (un derivado de pDrive, Invitrogen), y se elaboró Flag-FGF10 de un modo análogo. Los ADN plasmídicos se transfectaron en células 293F humanas. El sobrenadante de cultivo de las células 293F transfectadas se utilizó para el análisis de unión ligando-receptor.

Preparación de proteínas de fusión de FGFR2. Se expresaron el dominio extracelular (ECD) de FGFR2IIIb humano y de FGFR2IIIc humano como moléculas de inmunoadhesina. Para las formas alfa, se fusionaron los fragmentos de ADN que codificaban el ECD completo de FGFR2IIIb (aminoácidos 1-378) o FGFR2IIIc (aminoácidos 1-377) a Fc humano (residuos 216 a 446) a través de un conector polipeptídico; para las formas beta (sin D1) se utilizaron en su lugar los aminoácidos 152-378 para FGFR2(beta)IIIb y los aminoácidos 152-377 para FGFR2(beta)IIIc. Estas moléculas de FGFR2-Fc se expresaron transfectando las células 293F y seleccionando los transfectantes estables en presencia de G418 (1 mg/ml) en medio de expresión de 293 (Invitrogen). El FGFR2-Fc secretado desde las células 293F transfectadas se purificó utilizando una columna de proteína A/G. De un modo similar, se clonó ADNc de ECD de FGFR2 de mono cinomolgo (*cyno*) mediante técnicas convencionales a partir de ARNm de hígado de *cyno*, y se fusionaron los aminoácidos 1-378 a Fc humano para crear FGFR2IIIb-Fc de *cyno* para su expresión. Se construyó FGFR2IIIb-Fc de chimpancé utilizando la mutagénesis *in vitro* para convertir el aminoácido del ECD de FGFR2IIIb humano que difiere de FGFR2IIIb de chimp en el aminoácido de chimp (residuo metionina 186 a treonina, basándose en las secuencias conocidas de GenBank). Se adquirió proteína FGFR2(beta)IIIb-Fc de ratón de R&D Systems (Núm. de Catálogo 708-MF).

Análisis ELISA para el mAb que se une a la proteína de fusión de FGFR2. Las placas de ELISA se recubrieron con anti-IgG-Fc humana de cabra (2 µg/ml) durante la noche a 4°C. Los sitios de unión no específica se bloquearon con BSA al 2% durante 1 hr a RT. Las placas se incubaron con una de las proteínas de fusión de FGFR2 descritas anteriormente (1 µg/ml) durante 1 hr, seguido de incubación con diferentes concentraciones de mAb o fluidos de cultivo de hibridoma durante 1 hr. El mAb unido se detectó con anti-anticuerpo de ratón de Cabra conjugado con HRP seguido de lavado, adición de sustrato TMB (Sigma) y lectura a 450 nm. En todos los análisis ELISA, las placas se lavaron 3 veces entre cada etapa.

50 Citometría de flujo. Después de lavar dos veces en tampón de clasificación celular (CSB: PBS/FBS al 1%/NaN₃ al 0,02%), 2×10^5 las células se resuspendieron en 50 µl de CSB en un pocillo de microtitulación y se incubaron con 50 µl del mAb anti-FGFR2 que se iba a someter a ensayo (1 µg/50 µl) durante 1 hr sobre hielo. Las células se lavaron a continuación dos veces en CSB y los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con anti-IgG de ratón de cabra conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 1 hr sobre hielo. Después de lavar dos veces en CSB, las células se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson).

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales para FGFR2

Se inmunizaron ratones Balb/c (hembras de 5-6 semanas de edad) mediante inyección en las almohadillas de sus patas traseras a intervalos de 1 semana 20 o 22 veces con FGFR2(beta)IIIb-Fc (dosis inicial 10 µg/almohadilla,

después 5 µg/almohadilla), o con 17 dosis de FGFR2IIIc-Fc (dosis inicial 10 µg/almohadilla, después 5 dosis a 2 µg, después a 5 µg) seguido de 5 dosis de FGFR2(beta)IIIc-Fc (a 5 µg/almohadilla), con el antígeno suspendido en MPL/TDM (Sigma-Aldrich). Tres días después de la inyección final, se extrajeron las células linfoides popliteales y se fusionaron con células de mieloma de ratón P3/X63-Ag8U1 a una razón 1:1 utilizando un Hybrimmune Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences). Los hibridomas se seleccionaron mediante la adición de 2x HAT (Sigma) 24 hr más tarde. Diez días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo de hibridoma se escrutaron para determinar su capacidad para unirse a FGFR2IIIb-Fc pero no a IgG humana utilizando ELISA. A continuación se escrutaron los mAb seleccionados para determinar su capacidad para reconocer FGFR2IIIb sobre la línea de células tumorales gástricas humana SNU-16 (Shin et al, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 126:519, 2000). Los hibridomas seleccionados se clonaron a continuación dos veces utilizando la técnica de dilución limitante. Tres mAb seleccionados de este modo fueron GAL-FR21 y GAL-FR22 del primer régimen de inmunización, y GAL-FR23 del segundo régimen de inmunización. Las propiedades de estos mAb se muestran en la Fig. 2 como se describe a continuación.

Además, se obtuvieron otros numerosos mAb anti-FGFR2 a partir de las fusiones, incluyendo FR2bB 100.12.9, FR2bC 54.8.11, FR2bC 100.7.9, FR2bC 101.8.2, FR2bC 115.1.5, FR2bC 149.8.8, FR2bB 11.5.3, y FR2bB 18.1.6.

15 Ejemplo 3: Propiedades de los mAb anti-FGFR2

Como se observa en la Fig. 3, los tres mAb seleccionados GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 se unen bien a FGFR2IIIb en el análisis ELISA descrito en el Ejemplo 1. Utilizando las cuatro formas diferentes de FGFR2-Fc en el ELISA, se determinó que cada uno de estos mAb tiene un patrón de unión diferente y por lo tanto epítipo (Fig. 4). GAL-FR21 se une a las formas tanto alfa como beta de FGFR2III (esto es, con y sin D1), pero no a FGFRIIIc. El epítipo por lo tanto no puede implicar D1 y debe implicar D3IIIb, por lo que está probablemente incluido en D3IIIb o D3. GAL-FR22 también se une a las formas tanto alfa como beta, pero tanto en el contexto de IIIb como de IIIc, de manera que el epítipo está presumiblemente incluido en D2-D3IIIa o desde luego D2-D3. Finalmente, GAL-FR23 no se une a ninguna de las formas beta, de manera que su epítipo debe estar totalmente o parcialmente en D1. Por consiguiente, los mAb que tienen un epítipo en D1 o D2-D3 o D3 están incluidos en la presente invención.

Para confirmar que los mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 se unen a diferentes epítipos, se llevó a cabo un experimento de competición en el que cada mAb fue biotinilado, y a continuación se hicieron competir 0,4 µg del mAb biotinilado con un exceso 100:1 de cada uno de los otros mAb no marcados (o mAb murino de control 5G8) por la unión a FGFR2IIIb-Fc en el análisis ELISA descrito anteriormente (pero con HRP-estreptavidina como reactivo de detección). Como se observa en la Fig. 5, cada mAb competía consigo mismo por la unión pero no con los otros mAb, demostrando que tienen diferentes epítipos. Además, los otros mAbs FR2bB 100.12.9, FR2bC 54.8.11, FR2bC 100.7.9, FR2bC 101.8.2, Fr2bC 115.1.5, FR2bC 149.8.8 competían por la unión con GAL-FR21 biotinilado en este análisis de modo que tienen el mismo epítipo que GAL-FR21 o un epítipo solapante, mientras los mAb FR2bB 11.5.3, y FR2bB 18.1.6 competían por la unión con GAL-FR22 biotinilado de modo que tienen el mismo epítipo que GAL-FR22 o un epítipo solapante.

Para confirmar que los mAb seleccionados se unen a las formas apropiadas de FGFR2 sobre la membrana, se empleó la citometría de flujo. Se utilizaron células KATO-III (ATCC HTB-103) y SNU-16 (ATCC CRL-5974), que expresan en exceso FGFR2IIIb, para someter a ensayo la unión a esa forma del receptor. Como se observa en la Fig. 6, los tres mAb GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 se unen a ambas líneas celulares, como se esperaba a partir de sus epítipos descritos anteriormente. Se utilizaron células 293F humanas transfectadas con un gen para FGFRIIIc para someter a ensayo la unión a esa forma, después de verificar que ninguno de los mAb se une a las células 293F anfitrionas por sí mismas. Como se observa en la Fig. 7, GAL-FR22 y GALFR23 pero no GALFR21 se unen a células transfectadas con FGFRIIIb, como se esperaba a partir de sus epítipos. Finalmente, puesto que la mutación S252W de FGFR2 se encuentra en algunas células cancerosas, se sometió a ensayo la unión de los mAb a células 293F transfectadas con un gen FGFR2IIIb construido para que contuviera esa mutación (FGFR2IIIb(S252W)). Como también se observa en la Fig. 7, todos los mAb se unieron a las células transfectadas con FGFR2IIIb(S252W). La capacidad para unirse a FGFR2IIIb(S252W) es una propiedad preferida de los mAb de la invención.

Para determinar la capacidad de los mAb para inhibir la unión de los ligandos FGF a FGFR2, se utilizó un análisis ELISA. Los pocillos de ELISA se recubrieron con 2 µg/ml de anti-IgG-Fc humana de cabra durante la noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 2% durante 1 hr a RT, los pocillos se incubaron con 0,5 µg/ml de FGFR2IIIb-Fc durante 1 hr, seguido de incubación con Flag-FGF1 o Flag-FGF2 (0,2 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones de mAb durante 1 h. El Flag-FGF1 unido se detectó mediante la adición de anticuerpo anti-Flag M2 conjugado con HRP (Sigma) y posterior adición de sustrato TMB. Como se puede observar a partir de la Fig. 8A, el mAb GAL-FR21 bloqueó débilmente la unión de FGF1 a FGFR2IIIb en este análisis, pero GAL-FR22 y GAL-FR23 no bloquearon la unión de FGF1. En contraste GAL-FR21 bloqueó fuertemente la unión de FGF2 a FGFR2IIIb, GAL-FR22 bloqueó moderadamente la unión de FGF2, y GAL-FR23 no bloqueó la unión. En análisis similares, pero utilizando Flag-FGF7 y Flag-FGF10, también se demostró (Fig. 8B) que GAL-FR21 y GAL-FR22 bloquean la unión de FGF7 y FGF10 a FGFR2IIIb. En efecto, mAb ventajosos de la invención, como GAL-FR21 y GAL-FR22, bloquean la unión de FGF2, FGF7 y FGF10 a FGFR2IIIb, preferiblemente en 80% o 90% o 95% o completamente o esencialmente completamente. Por consiguiente se ha demostrado que GAL-FR21 y GAL-FR22 pero no GAL-FR23 neutralizan al menos una actividad biológica de FGFR2.

Ejemplo 4: Modelos de xenoinjerto

Se llevan a cabo experimentos de xenoinjerto como se ha descrito previamente (Kim et al., Nature 362:841,1993). Se cosechan en HBSS células tumorales humanas típicamente desarrolladas en medio DMEM completo. Se inyectan subcutáneamente en ratones carentes de sistema inmunitario hembra o ratones NIH-III Xid/Beige/nud (4-6 semanas de edad) $2-10 \times 10^6$ células en 0,1 ml de HBSS en las áreas dorsales. Cuando el tamaño del tumor alcanza 50-100 mm³, los ratones se agrupan al azar y se les administran 5 mg/kg (100 µg total) o alguna otra dosificación de mAb i.p. dos veces por semana en un volumen de 0,1 ml. Los tamaños de los tumores se determinan dos veces por semana midiendo en dos dimensiones [longitud (a) y anchura (b)]. El volumen tumoral se calcula de acuerdo con $V = ab^2/2$ y se expresa como el volumen tumoral medio \pm ETM. El número de ratones en cada Grupo de tratamiento es típicamente de 5-7 ratones. Se puede realizar un análisis estadístico, p. ej., utilizando la prueba T de Student.

Las Figuras 9 y 10A demuestran que en diversos experimentos GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23 administrados a un nivel de dosificación de 20 µg (1 mg/kg) dos veces por semana inhibieron todos fuertemente el crecimiento de xenoinjertos de tumor gástrico SNU-16, siendo GAL-FR21 el más potente e inhibiendo completamente el crecimiento del xenoinjerto. El mAb FR2bC 54.8.11 mencionado anteriormente que compite por la unión con GAL-FR21 también inhibió el crecimiento del xenoinjerto. La Fig. 10B demuestra que GAL-FR21 y GAL-FR22 administrados a un nivel de dosificación de 50 µg (2,5 mg/kg) dos veces por semana también inhibió fuertemente el crecimiento de xenoinjertos de la línea celular de tumor gástrico humano OCUM-2M (que se describe en Yashiro et al., Jpn J Cancer Res 85:883, 1994). De un modo similar se muestra la capacidad de los mAb para inhibir los xenoinjertos de KATO III u otras líneas celulares que expresan FGFR2. La capacidad de los mAb para inhibir el crecimiento tumoral aditivamente o sinérgicamente con otros agentes anti-tumorales descritos anteriormente se demuestra tratando Grupos de ratones xenoinjertados con el mAb solo, el otro agente solo, y el mAb junto con el otro agente, y observando que el tratamiento con ambos agentes tiene un efecto inhibitor mayor que cualquiera de los agentes solo.

Ejemplo 5: Unión de los mAb a FGFR2 de otra especie

Para determinar la capacidad de los mAb para unirse a FGFR2 de especies distintas de la humana, se utilizaron análisis ELISA. Los pocillos de ELISA se recubrieron con 2 µg/ml de anti-IgG-Fc humana de cabra durante la noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 2% durante 1 hr a RT, los pocillos se incubaron con 0,2 µg/ml de FGFR2IIIb-Fc durante 1 hr, donde el FGFR2IIIb de la proteína de fusión fue FGFR2IIIb humano, de ratón, de mono cinomolgo o de chimpancé. Los pocillos se incubaron a continuación con diferentes concentraciones de mAb GAL-FR21 o GAL-FR22. Los mAb unidos se detectaron mediante la adición de anti-IgG-Fc de ratón de cabra conjugado con HRP y a continuación sustrato TMB. La Fig. 11 demuestra que GAL-FR21 se une a FGFR2 de ratón casi tan bien (10 veces) como a FGFR2 humano, mientras GAL-FR22 se une a FGFR2 de ratón moderadamente bien (aproximadamente 100 veces el de FGFR2 humano). La Fig. 12 demuestra que GAL-FR21 se une a FGFR2 de mono cinomolgo tan bien (sin distinción) como a FGFR2 humano, mientras GAL-FR22 se une a FGFR2 de mono cinomolgo moderadamente bien (aproximadamente 100 veces el de FGFR2 humano). Un experimento similar con FGFR2 de chimpancé dio los mismos resultados que con FGFR2 de mono cinomolgo: GAL-FR21 se unió a FGFR2 de chimpancé tan bien (sin distinción) como a FGFR2 humano, mientras GAL-FR22 se unió a FGFR2 de chimpancé moderadamente bien (aproximadamente 100 veces el de FGFR2 humano). Los mAb preferidos, como GAL-FR21 y GAL-FR22, se unen a los FGFR2 de ratón, mono, chimpancé y ser humano, y muy preferiblemente se unen a FGFR2 de ratón tan bien como 2, 10, 100 o 1000 veces el de FGFR2 humano, y/o se unen a FGFR2 de mono y/o chimpancé 2, 10 o 100 veces o sin distinción de (en una variación experimental) FGFR2 humano (medido, p. ej., por medio de K_a). La unión a FGFR2 de otras especies hace que el ensayo de los mAb en esas especies animales sea más fácil de realizar.

Ejemplo 6: Humanización de GAL-FR21 y GAL-FR22

La clonación de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del mAb GAL-FR21, la construcción y la expresión de un mAb quimérico, y el diseño, la construcción, la expresión y la purificación de un mAb GAL-FR21 humanizado se llevaron a cabo utilizando métodos convencionales de la biología molecular, p. ej., como se describe en el documento US 2008019974 para el mAb L2G7. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables (V) de las cadenas ligera y pesada (maduras) de GAL-FR21 se muestran respectivamente en las Figs. 13A y 13B, líneas superiores indicadas con GAL-FR21. Más específicamente, para diseñar un mAb GAL-FR21 humanizado, se siguieron en general los métodos de Queen et al., Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.530.101 y 5.585.089. La secuencia de V_K humana CAG27369 y la secuencia de VH AAB00780, mostradas respectivamente en las Figs. 13A y 13B, líneas inferiores, se seleccionaron respectivamente para que sirvieran como secuenciasceptoras para las secuencias de VL y VH de GAL-FR21 debido a que tienen una homología del marco particularmente elevada (esto es, identidad de secuencia) con las mismas. Se utilizó un modelo molecular generado por ordenador del dominio variable de GAL-FR21 para localizar los aminoácidos en el marco de GAL-FR21 que están suficientemente próximos a las CDR como para interactuar potencialmente con ellas. Para diseñar las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de GAL-FR21 humanizado, se injertaron primero conceptualmente las CDR del mAb GAL-FR21 de ratón en las regiones marcoceptoras. En las posiciones del marco en las que el modelo por ordenador sugirió un contacto significativo con las CDR, que puede ser necesario para mantener la conformación de las CDR, los aminoácidos del anticuerpo de ratón se sustituyeron por los aminoácidos del marco humano. Para el mAb GAL-

FR21 humanizado diseñado HuGAL-FR21, esto se realizó en los residuos 27, 28, 30 (en el bucle hipervariable de Chothia H1) y 48 y 67 de la cadena pesada y en ningún residuo de la cadena ligera, utilizando la numeración de Kabat. Las secuencias de la región V de las cadenas ligera y pesada de HuGAL-FR21 se muestran en las Figs. 13A y 13B respectivamente, líneas medias indicadas por HuGAL-FR21, donde se alinean frente a las respectivas regiones V donadora y aceptora humana de GAL-FR21 - las CDR (según define Kabat) están subrayadas y los aminoácidos sustituidos enumerados más arriba están doblemente subrayados.

La invención proporciona no solamente un mAb GAL-FR21 humanizado, HuGAL-FR21, que incluye las regiones V de las cadenas ligera y pesada mostradas en la Fig. 13, sino también mAb humanizados variantes cuyas regiones variables de las cadenas ligera y pesada difieren de las secuencias de HuGAL-FR21 en un pequeño número (p. ej., típicamente no más de 1, 2, 3, 5 o 10) de remplazos, deleciones o inserciones, normalmente en el marco pero posiblemente en las CDR. En particular, solamente se puede realizar un subgrupo de las sustituciones descritas anteriormente en los marcos aceptores, o se pueden realizar una o varias sustituciones adicionales, p. ej., el aminoácido 69L de la VH de GAL-FR21 de ratón puede remplazar al aminoácido 691 aceptor, y/o los aminoácidos de ratón pueden remplazar los respectivos aminoácidos de la cadena ligera humanizada en cualquiera de las posiciones numeradas por Kabat 1, 3 y 60 y 63, que tienen cierta proximidad a las CDR. En efecto, muchos de los residuos del marco que no están en contacto con las CDR en el mAb humanizado pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las correspondientes posiciones del mAb de ratón donador u otros anticuerpos de ratón o humanos, e incluso muchos residuos con contacto con CDR potenciales también son susceptibles de sustitución o incluso se pueden alterar aminoácidos dentro de las CDR. Un ejemplo de una sustitución en la CDR consiste en sustituir un residuo en una CDR por un residuo que ocupa la correspondiente posición de la secuencia aceptora humana utilizada para suministrar marcos de regiones variables.

La mayor parte de los remplazos realizados en las secuencias de GAL-FR21 humanizado variante son conservativas con respecto a los aminoácidos de HuGAL-FR21 remplazados. Los aminoácidos se pueden agrupar como sigue para determinar las sustituciones conservativas, esto es, sustituciones dentro de un grupo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales alcalinas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe.

Preferiblemente, los remplazos en HuGAL-FR21 (sean o no conservativos) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad de unión o la potencia del mAb humanizado, esto es, su capacidad para neutralizar las actividades biológicas de FGFR2 (p. ej., la potencia en algunos o todos los análisis descritos en la presente memoria del mAb GAL-FR21 humanizado variante es esencialmente la misma, esto es, dentro del error experimental, que la de HuGAL-FR21). Preferiblemente las secuencias de la región V de las cadenas ligera y pesada variantes maduras son idénticas al menos en 90%, más preferiblemente al menos en 95%, y lo más preferiblemente al menos en 98% a las respectivas regiones V de las cadenas ligera y pesada maduras de HuGAL-FR21. Alternativamente, también son adecuadas otras regiones variables de anticuerpos humanos con una elevada identidad de secuencia con las de GAL-FR21 para proporcionar el marco de anticuerpo humanizado, especialmente regiones V kappa del subgrupo I humano y regiones V de la cadena pesada del subgrupo I humano, o secuencias consenso de estos subgrupos.

En otros anticuerpos humanizados, al menos 1, 2, 3, 4, o las 5 posiciones de las sustituciones de aceptor por donador mencionadas en conexión con el anticuerpo ilustrado (esto es, H27, H28, H30, H48, H67) están preferiblemente ocupadas por el residuo que ocupa la correspondiente posición de la cadena pesada del anticuerpo donador de ratón. Si la secuencia aceptora de la cadena pesada es distinta de AAB00780, se puede requerir o no una sustitución de aceptor por donador para la ocupación especificada de una posición de la región marco variable concreta dependiendo de si el residuo que ocupa la posición especificada ya es el mismo entre el aceptor y el donador.

El mAb ilustrativo HuGAL-FR21 comentado aquí tiene regiones constantes κ e $\gamma 1$ humanas, p. ej., como se presenta en el documento US 2008019974, y es por lo tanto una IgG1. Las secuencias completas de las cadenas ligera y pesada (maduras) de HuGAL-FR21 se muestran en la Fig. 14. Si bien estas secuencias son respectivamente de los alotipos Km(3) y G1m(3), se entiende que los mAb IgG1 de cualquier alotipo (IgG1, κ) están incluidos en la denominación HuGAL-FR21. También se entenderá que cuando HuGAL-FR21 es fabricado mediante procedimientos convencionales, de uno a varios aminoácidos del extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, tales como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden estar ausentes o ser derivatizados en una proporción o todas las moléculas, y semejante composición todavía estará incluida en la denominación HuGAL-FR21 y se considerará un mAb GAL-FR21 humanizado. Los mAbs humanizados de otros isotipos (p. ej., IgG2, IgG3 e IgG4) se pueden elaborar combinando las regiones variables de HuGAL-FR21 con las regiones constantes humanas apropiadas. Se pueden realizar remplazos en las regiones constantes de HuGAL-FR21 para reducir o aumentar la función efectora tal como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véanse, p. ej., Winter et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821; Tso et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.834.597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en los seres humanos (véase, p. ej., Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Específicamente pero sin limitación, los HuGAL-FR21 que tienen mutaciones en la región constante de IgG a Gln en la posición 250 y/o Leu en la posición 428 son realizaciones de la presente invención.

- Para comparar la afinidad de unión de HuGAL-FR21 con la del mAb GAL-FR21 de ratón, se llevó a cabo un experimento de unión competitiva utilizando la tecnología ELISA convencional. Específicamente, los pocillos de ELISA se recubrieron con 2 µg/ml de anti-IgG-Fc humana de cabra durante la noche a 4°C. Después del bloqueo con BSA al 2% durante 1 hr a RT, los pocillos se incubaron con 0,5 µg/ml de FGFR2IIIb-Fc. Los pocillos se incubaron con mAb GAL-FR21 biotinilado (0,05 µg/ml) en presencia de concentraciones crecientes de GAL-FR21 no marcado, HuGAL-FR21 o anticuerpo hIgG humano de control. El nivel de GAL-FR21 biotinilado unido se determinó mediante la adición de HRP-estreptavidina y sustrato. Como se muestra en la Fig. 15, HuGAL-FR21 y GAL-FR21 compitieron aproximadamente igual de bien, siendo HuGAL-FR21 posiblemente ligeramente mejor, indicando que la afinidad de unión a FGFR2 de HuGAL-FR21 es al menos tan elevada como la del mAb GAL-FR21 (ratón). A partir de la concentración de HuGAL-FR21 requerida para inhibir la unión del mAb marcado en 50%, se puede estimar que la afinidad de unión K_d de HuGAL-FR21 a FGFR2 es de al menos aproximadamente $10^9 M^{-1}$. HuGAL-FR21 también se puede someter a ensayo en cualquiera de los análisis biológicos para determinar la actividad de FGFR2 descrito en la presente memoria, p. ej., inhibición de la unión de FGF2 o FGF7 a FGFR2, e inhibirá la actividad de FGFR2 de manera comparable a GAL-FR21.
- Se puede diseñar, construir, producir y analizar un mAb GAL-FR22 humanizado de la misma manera o de una manera similar a la del HuGAL-FR22. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada (madura) de GAL-FR22 se muestran respectivamente en las Figs. 16A y 16B, líneas indicadas por GAL-FR22. Un mAb GAL-FR22 humanizado tiene una cadena ligera humanizada que comprende CDR de la secuencia de la Fig. 16A y una cadena pesada humanizada que comprende CDR de la secuencia de la Fig. 16B. En algunos casos, el mAb GAL-FR22 humanizado comprende las tres CDR de la cadena ligera mostradas en la Fig. 16A y las tres CDR de la cadena pesada mostradas en la Fig. 16B. Preferiblemente, el mAb GAL-FR22 humanizado tiene una afinidad de unión para FGFR2 2 o 3 veces la afinidad del mAb GAL-FR22 de ratón, y lo más preferiblemente tiene una afinidad de unión indistinguible o mayor que la del mAb GAL-FR22, medida, p. ej., por medio de un ELISA de competición como se describe para HuGAL-FR21 y GAL-FR21.
- Aunque la invención ha sido descrita con referencia a las realizaciones preferidas actualmente, se debe entender que se pueden realizar diversas modificaciones sin salirse de la invención. A menos que resulte evidente de otro modo a partir del contexto, cualquier etapa, elemento, realización, rasgo o aspecto de la descripción puede ser utilizado con cualquier otro. Si una secuencia de ácido nucleico o proteína asociada con un número de acceso se cambia, prevalece la versión de la secuencia asociada con este número de acceso de 7 de Noviembre de 2008.
- Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales GAL-FR21, GAL-FR22, y GAL-FR23 han sido depositados en la Colección de Cultivos Tipo Americana, P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, respectivamente con los Números ATCC PTA-9586 de 6 de Noviembre, 2008, PTA-9587 de 6 de Noviembre, 2008 y PTA-9408 de 12 de Agosto, 2008, bajo el Tratado de Budapest. Estos depósitos se mantendrán en un depósito autorizado y se sustituirán en caso de mutación, no viabilidad o destrucción durante un período de al menos cinco años después de que el depósito haya recibido la solicitud más reciente para la salida de una muestra, durante un período de al menos treinta años después de la fecha del depósito, o durante la vida aplicable de la patente relacionada, el que sea más largo. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de estas líneas celulares serán retiradas de manera irrevocable tras la expedición de una patente a partir de la solicitud.

Párrafos relevantes

1. Un anticuerpo monoclonal (mAb) humano o humanizado que se une al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2), e inhibe el crecimiento de un tumor humano xenoinjertado en un ratón.
2. El mAb del párrafo 1 que inhibe la unión de FGF2 a FGFR2.
3. El mAb del párrafo 1 que se une a FGFR2IIIb pero no a FGFR2IIIc.
4. El mAb del párrafo 1 que está humanizado.
5. El mAb del párrafo 1 que es un fragmento de Fab o $F(ab')_2$ o un anticuerpo de cadena sencilla.
6. Una composición farmacéutica que comprende un mAb del párrafo 1.
7. Un método para tratar el cáncer en un paciente que comprenden administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende el mAb del párrafo 1.
8. Un anticuerpo monoclonal (mAb) que compite por la unión a FGFR2 con un anticuerpo seleccionado del grupo de GAL-FR21, GAL-FR22 y GAL-FR23, en donde el mAb está modificado genéticamente.
9. El mAb del párrafo 8 que inhibe el crecimiento de un tumor humano SNU-16 xenoinjertado en un ratón.
10. El mAb del párrafo 8 que es quimérico o humanizado.
11. El mAb del párrafo 8 que es un mAb GAL-FR21 o GAL-FR22 humanizado.

12. El mAb del párrafo 8 que es humano.
13. Una composición farmacéutica que comprende un mAb del párrafo 8.
14. Un método de tratamiento del cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende el mAb del párrafo 8.
- 5 15. El método del párrafo 14 en donde dicho cáncer es cáncer gástrico.
16. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena ligera humanizada que comprende CDRs de la secuencia en la Fig. 13A (GAL-FR21) y una cadena pesada humanizada que comprende CDRs de la secuencia de la Fig. 13B (GAL-FR21), o que comprende una cadena ligera humanizada que comprende CDRs de la secuencia en la Fig. 16A (GAL-FR22) y una cadena pesada humanizada que comprende CDRs de la secuencia de la Fig. 16B (GAL-FR22).
- 10 17. Un anticuerpo humanizado del párrafo 16, que comprende las tres cadenas ligeras CDRs mostradas en la Fig. 13A (GAL-FR21) y las tres cadenas pesadas CDRs mostradas en la Fig. 13B (GAL-FR21), o que comprende las tres cadenas ligeras CDRs mostradas en la Fig. 16A (GAL-FR22) y las tres cadenas pesadas CDRs mostradas en la Fig. 16B (GAL-FR22).
- 15 18. un anticuerpo humanizado del párrafo 17, en donde la región variable de la cadena ligera tiene al menos 95% de identidad de secuencia a la secuencia mostrada en la Fig. 13A (HuGAL-FR21) y la región variable de la cadena pesada tiene al menos 95% de identidad de secuencia a la secuencia mostrada en la Fig. 13B (HuGAL-FR21).
19. El anticuerpo humanizado de la figura 18, en donde los residuos H27, H28, H30, H48, y H67 por la numeración de Kabat están ocupados por el residuo que ocupa la correspondiente posición de la cadena pesada mostrada en la Fig. 13B (GAL-FR21).
- 20 20. El anticuerpo humanizado del párrafo 19, en donde la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia mostrada en la Fig. 13A (HuGAL-FR21) y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia mostrada en la Fig. 13B (HuGAL-FR21).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal (mAb) humanizado, humano o genéticamente modificado que se une a FGFR2IIIb pero no a FGFR2IIIc e inhibe el crecimiento de un tumor humano xenoinjertado en un ratón, en donde el mAb
- 5 (i) compite por la unión a FGFR2 con el anticuerpo monoclonal GAL-FR21 depositado bajo número ATTC PTA-9586, y
(ii) inhibe la unión de FGF2, FGF7 y FGF10 a FGFR2IIIb.
2. El mAb de la reivindicación 1 que es un fragmento de Fab o F(ab')₂ o un anticuerpo de cadena sencilla.
3. El mAb de las reivindicaciones 1 o 2 que compite por la unión a FGFR2 con el anticuerpo monoclonal GAL-FR21 depositado bajo en número de ATCC PTA-9586, en donde el mAb está modificado genéticamente.
- 10 4. El mAb de la reivindicación 3 que inhibe el crecimiento de un tumor humano SNU-16 xenoinjertado en un ratón.
5. El mAb de la reivindicación 3 que es quimérico o humanizado.
6. El mAb de la reivindicación 3 que es humano.
- 15 7. Una composición farmacéutica que comprende el mAb de la reivindicación 1.
8. El mAb de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento del cáncer.
9. El mAb de la reivindicación 8 para uso según la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer gástrico.

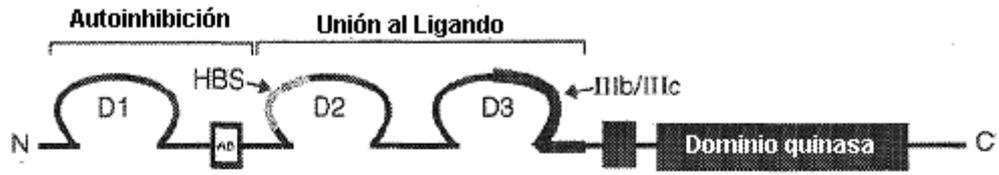


FIGURA 1

	Isotipo	Epítopo	ELISA de bloqueo		FACS			<i>In vivo</i>
			FGFR2IIIb que se une a		SNU-16	Transfectante 293		
			Flag-FGF1	Flag-FGF2		Vivo	Fijado	
GAL-FR21	IgG ₁	D3	+	+++	+++	+++	+++	Anti-tumor
GAL-FR22	IgG _{2b}	D2-D3	-	++	+++	-	+++	SNU-16
GAL-FR23	IgG _{2b}	D1	-	-	+++	+	+++	+++

FIGURA 2

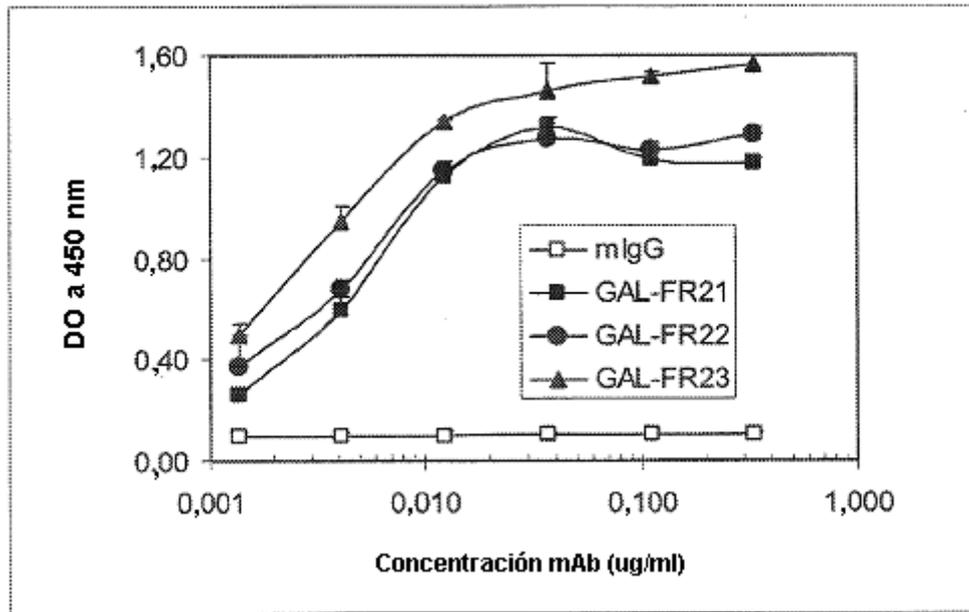


FIGURA 3

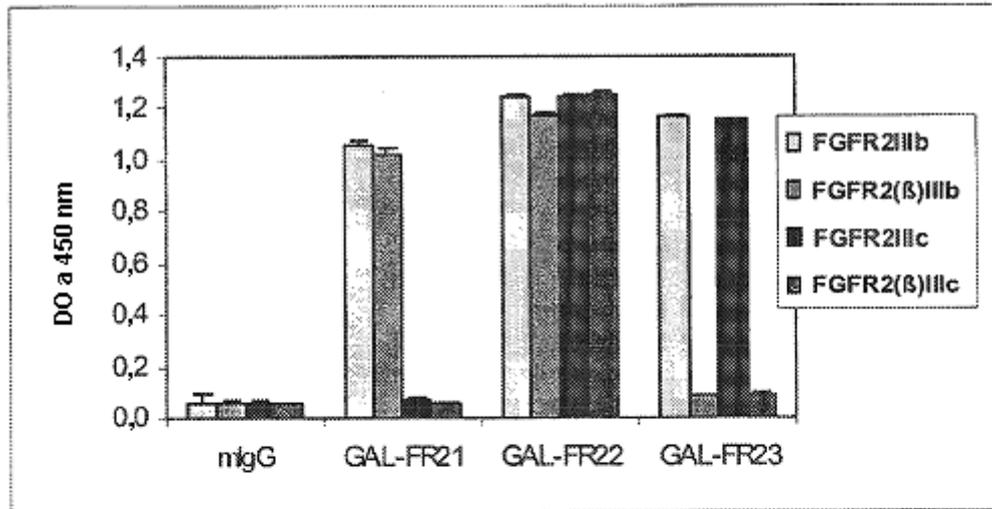


FIGURA 4

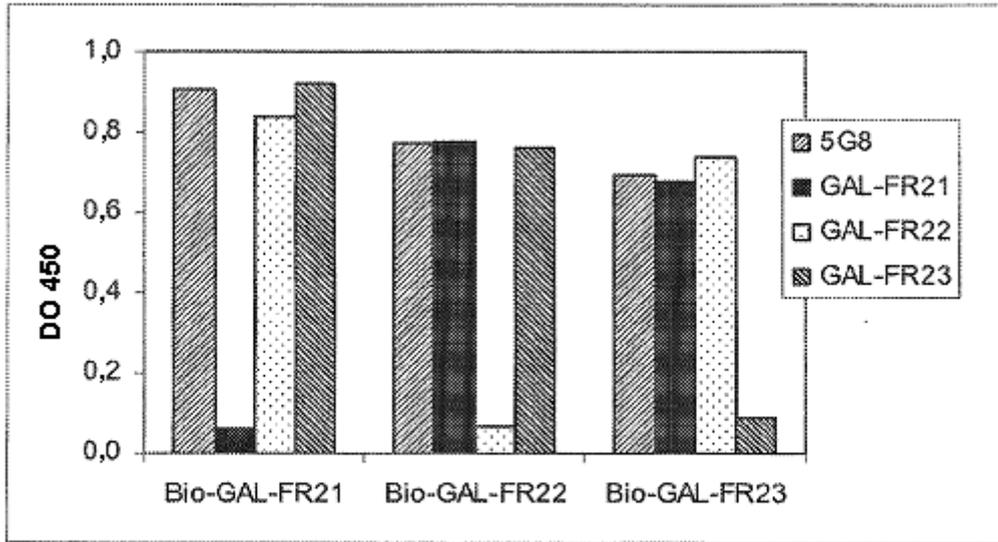


FIGURA 5

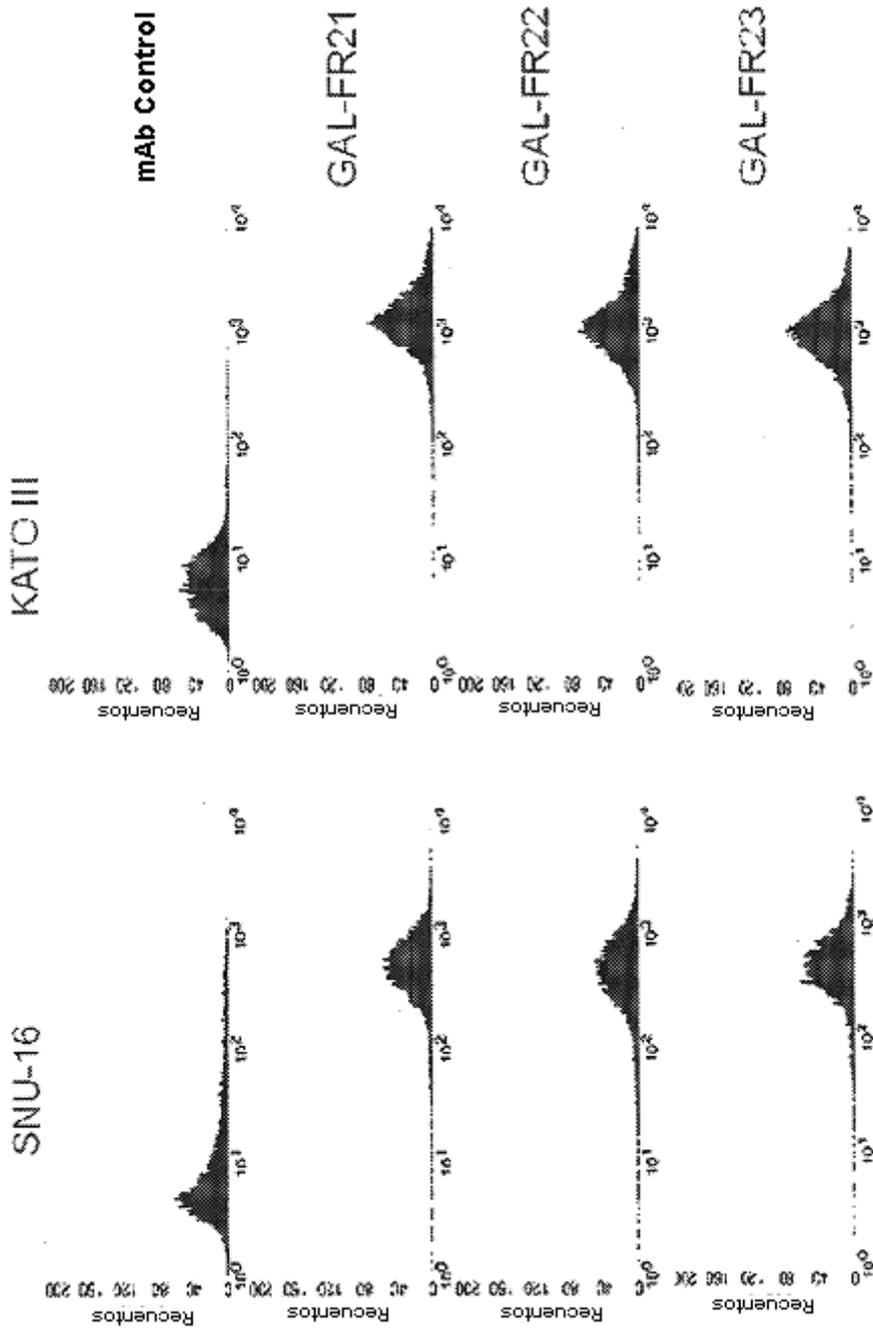


FIGURA 6

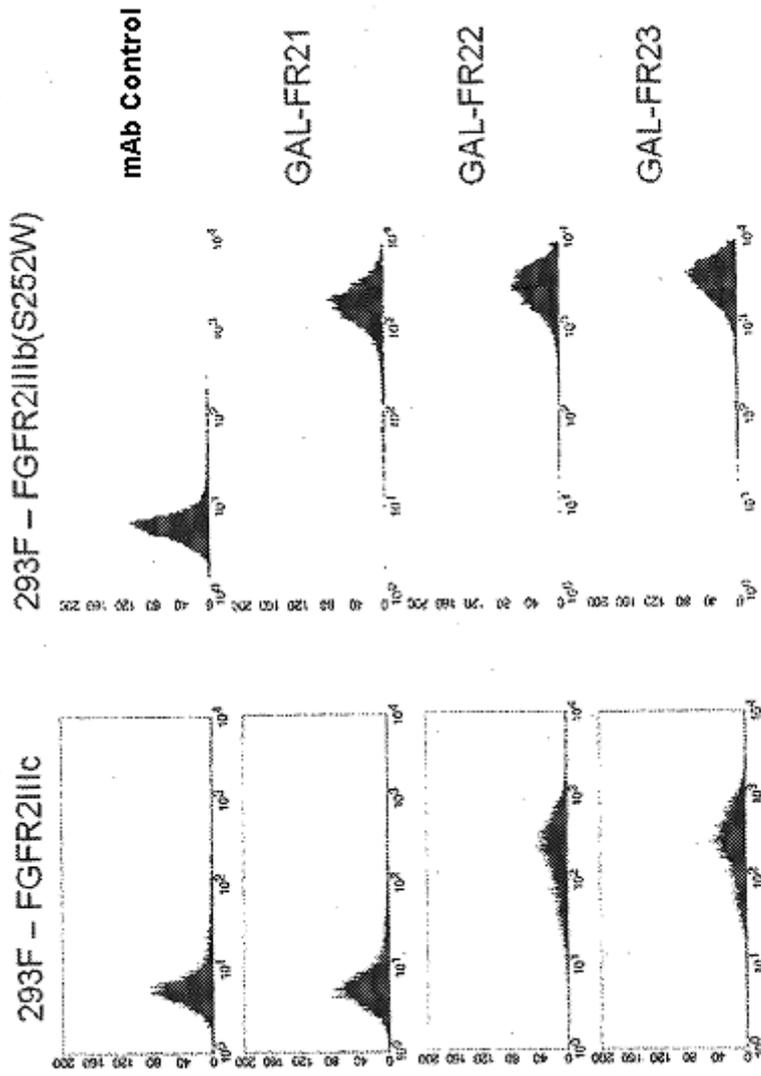


FIGURA 7

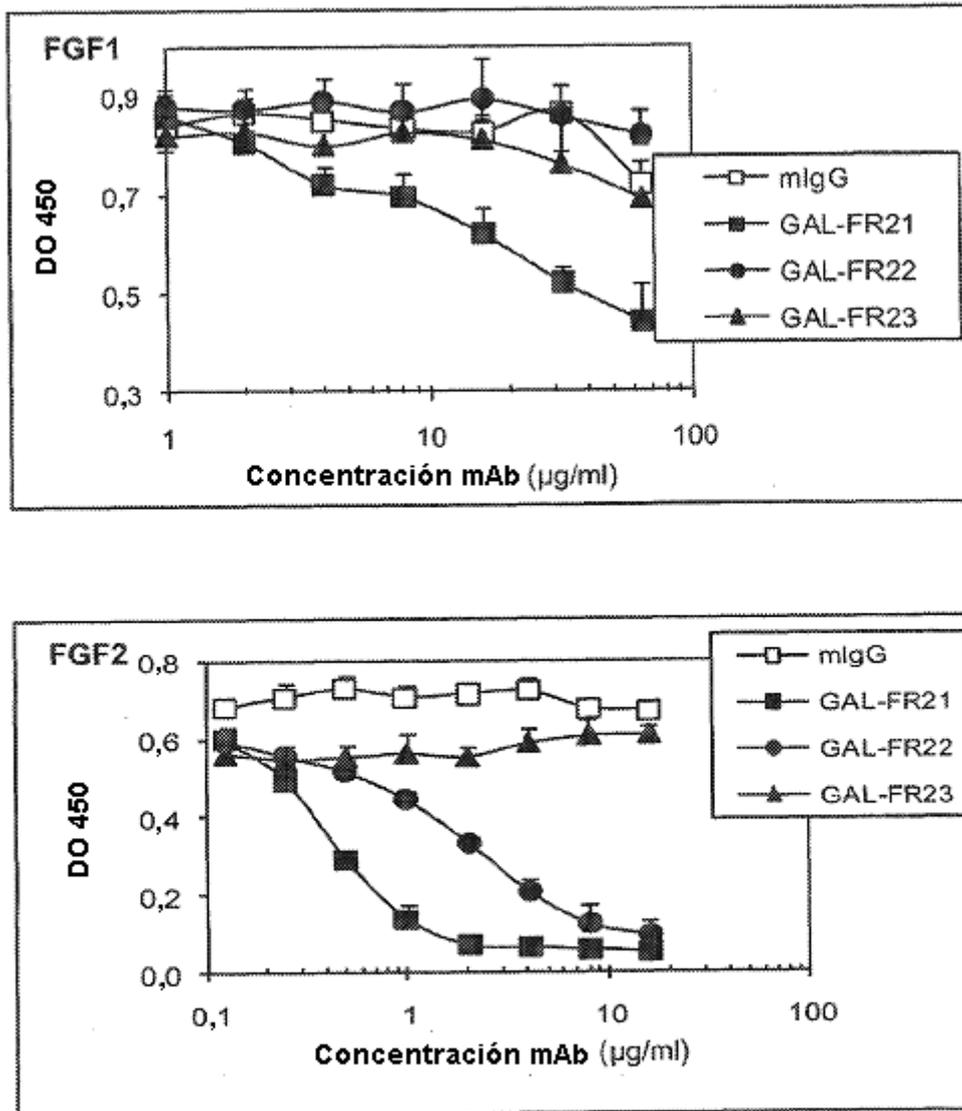


FIGURA 8A

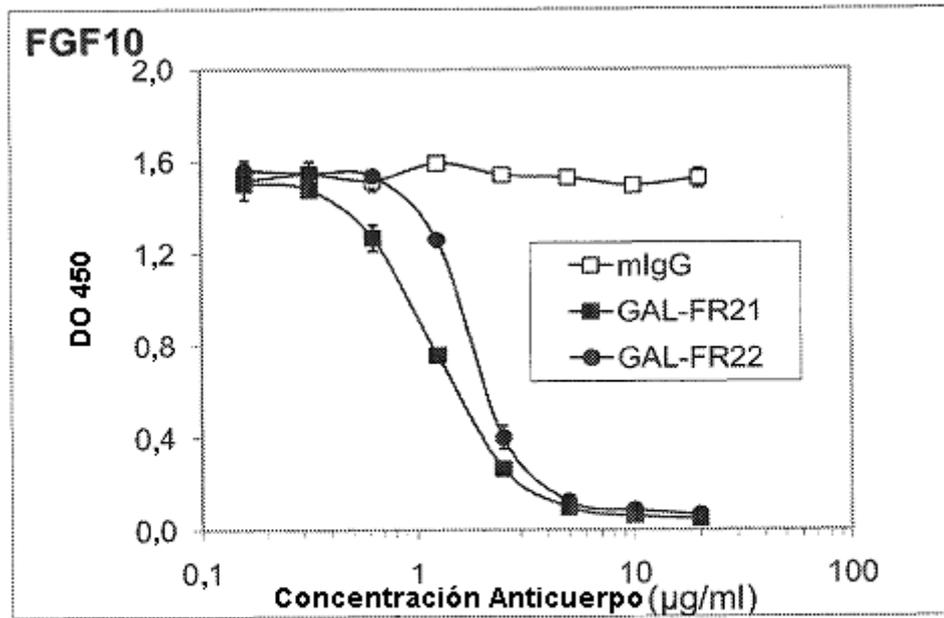
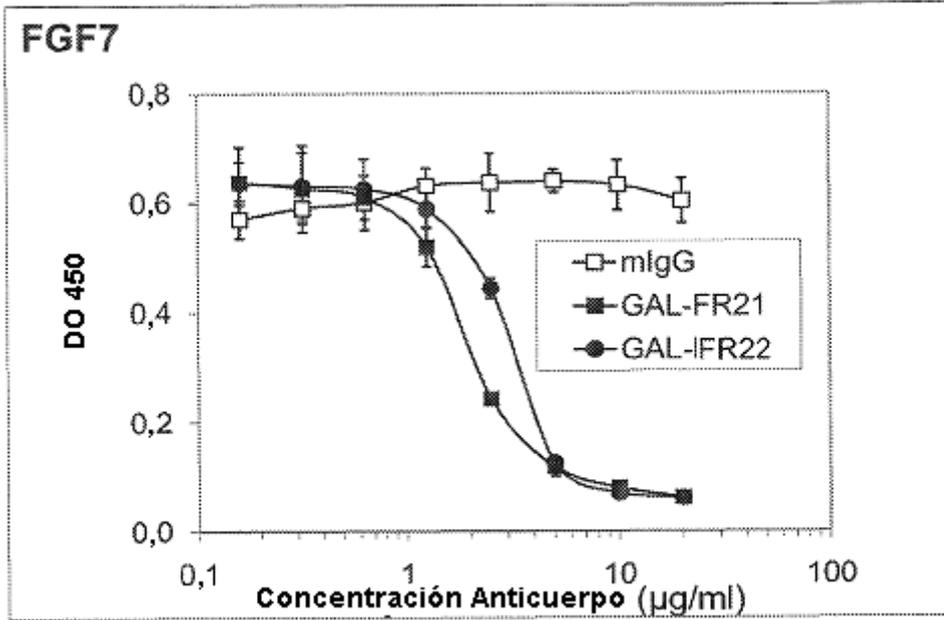


FIGURA 8B

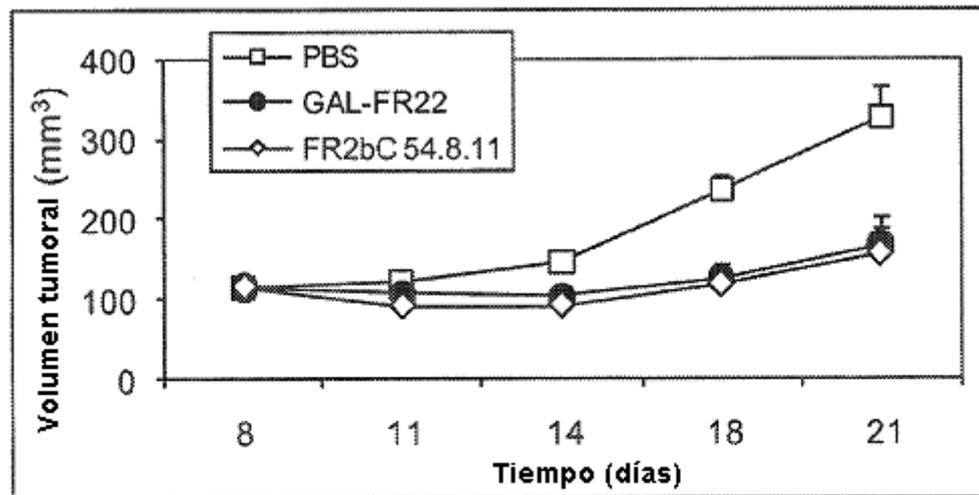
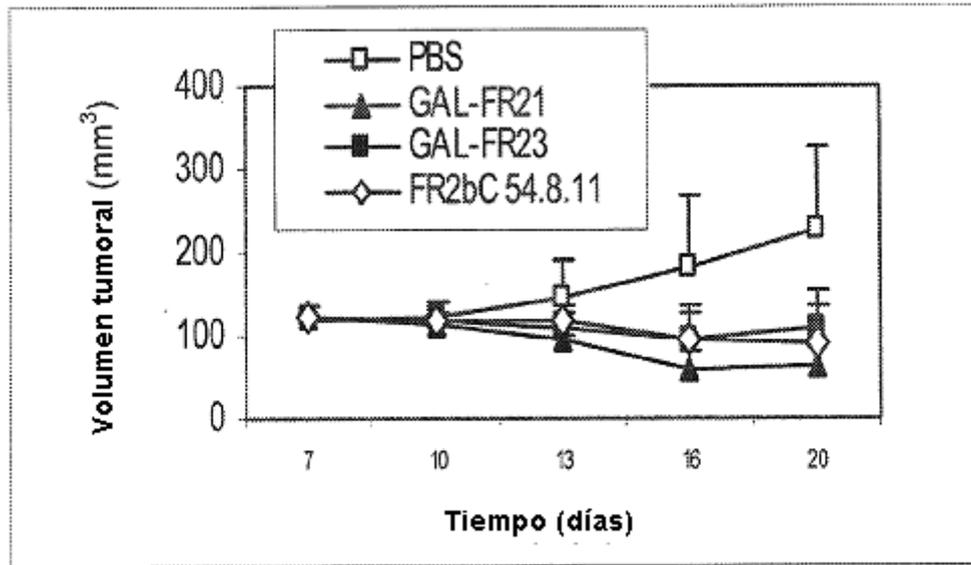


FIGURA 9

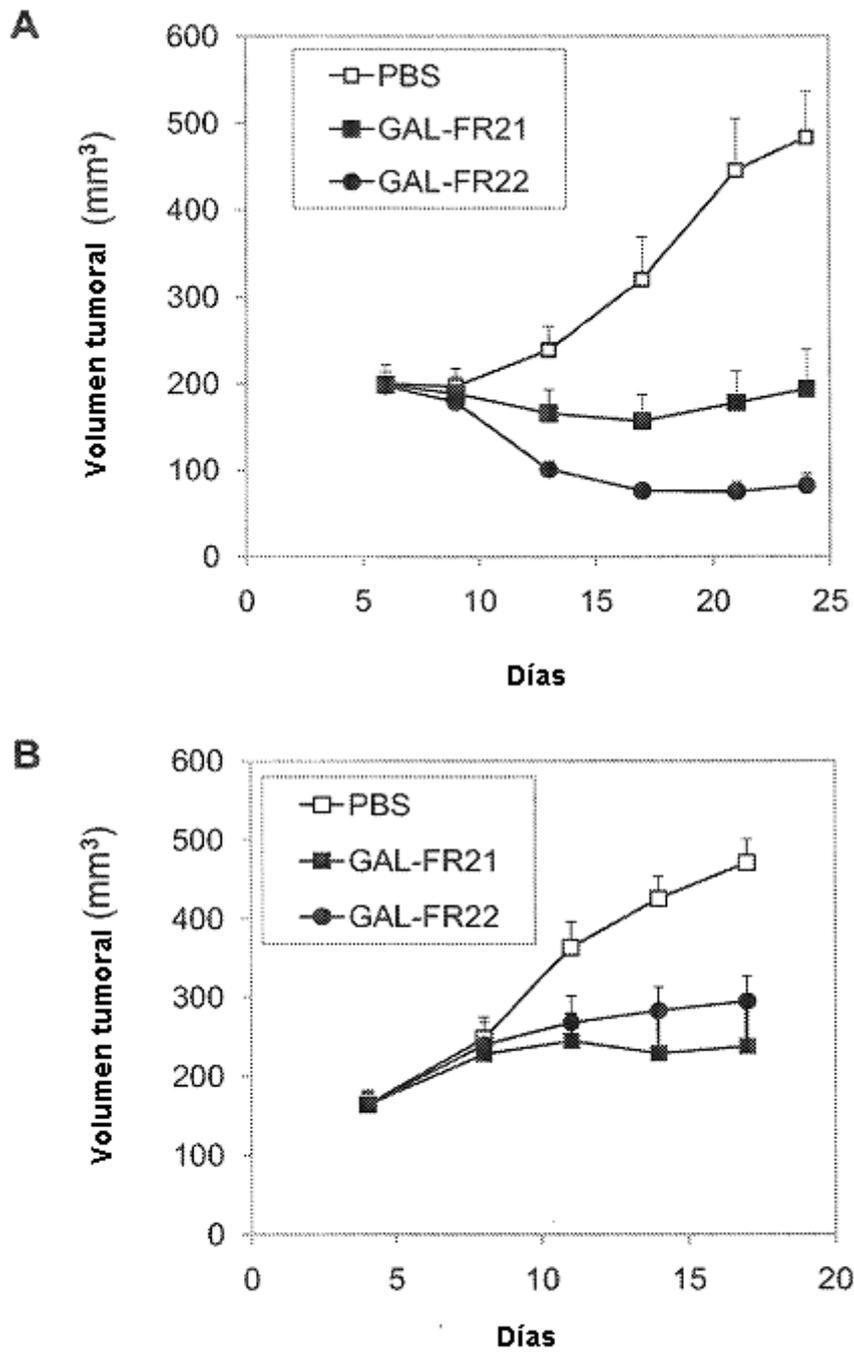


FIGURA 10

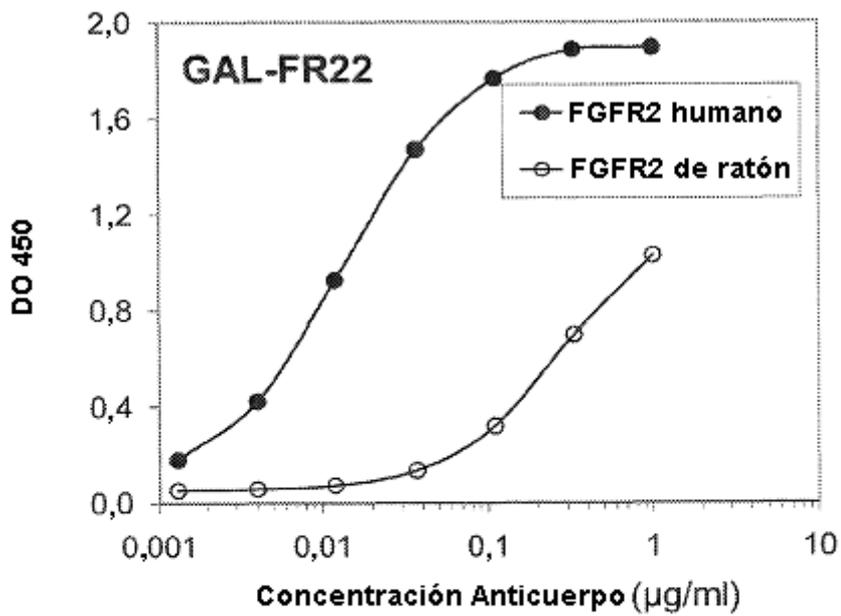
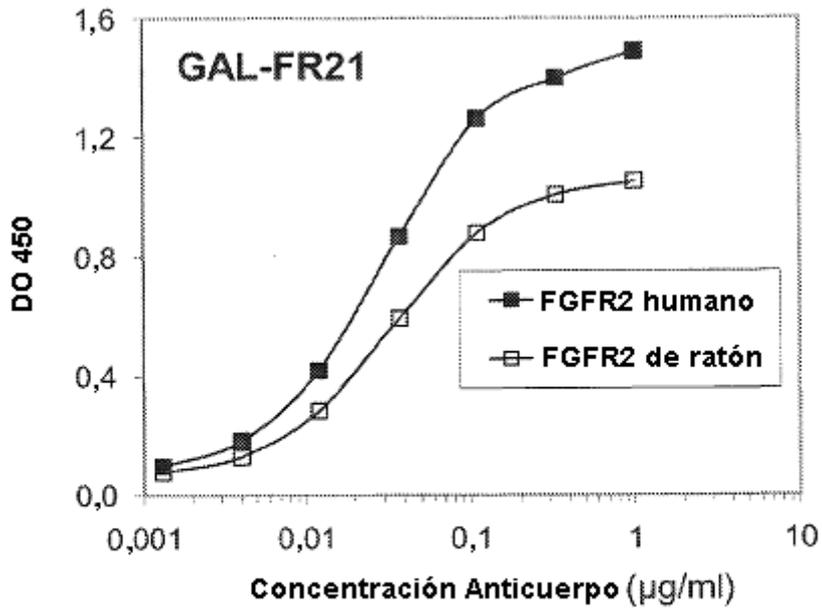


FIGURA 11

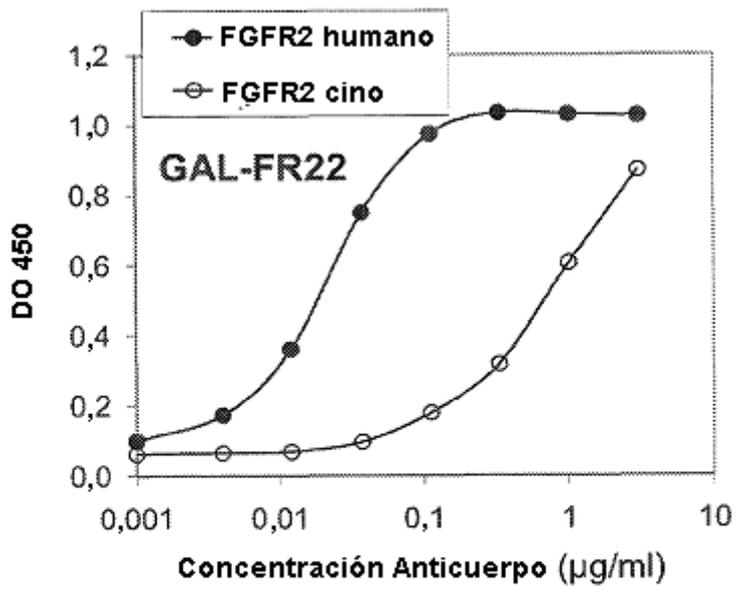
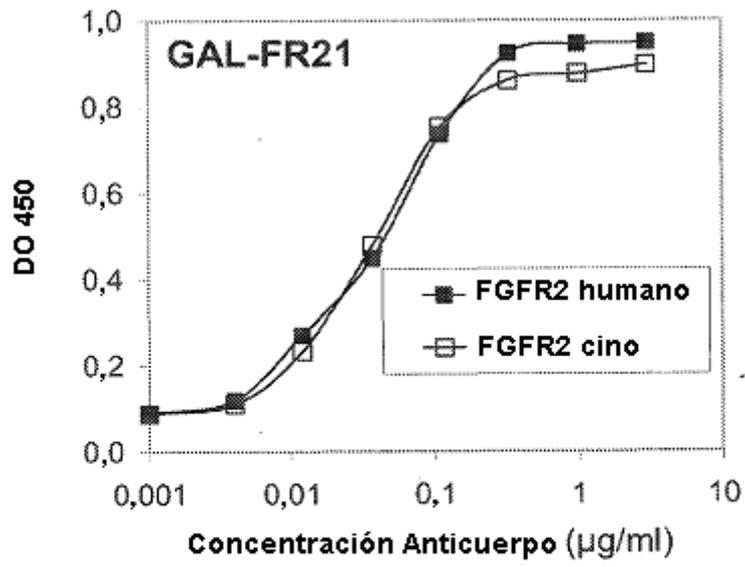


FIGURA 12

A

	1	2	3	4
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	<u>NIVMTQSPKS</u>	<u>MSMSVGDRVS</u>	<u>ITCKASQGVs</u>	<u>NDVAWYQKKP</u>
HuGAL-FR21	<u>DIQMTQSPSS</u>	<u>LSASVGDRVT</u>	<u>ITCKASQGVs</u>	<u>NDVAWYQqKP</u>
CAG27369	<u>DIQMTQSPSS</u>	<u>LSASVGDRVT</u>	<u>ITCqasqdis</u>	<u>nylnWYQqKP</u>
	5	6	7	8
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	<u>GQSPKLLIYS</u>	<u>ASYRYTGVPD</u>	<u>RFTGSGSGTD</u>	<u>FTFTISNVQA</u>
HuGAL-FR21	<u>GKAPKLLIYS</u>	<u>ASYRYTGVPs</u>	<u>RFSGSGSGTD</u>	<u>FTFTISSLQP</u>
CAG27369	<u>GKAPKLLIYd</u>	<u>asnletGVPS</u>	<u>RFSGSGSGTD</u>	<u>FTFTISSLQP</u>
	9	10		
	1234567890	1234567890	1234567	
GAL-FR21	<u>EDLAVYYCQq</u>	<u>HSTTPYTFGG</u>	<u>GTKLEIK</u>	
HuGAL-FR21	<u>EDIATYYCQq</u>	<u>HSTTPYTFGQ</u>	<u>GTKLEIK</u>	
CAG27369	<u>EDIATYYCqq</u>	<u>ydnlpptFGQ</u>	<u>GTKLEIK</u>	

B

	1	2	3	4
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	<u>QVQLQOPGAE</u>	<u>VVKPGASVKM</u>	<u>SCKASGYIFT</u>	<u>TYNVHWVKQT</u>
HuGAL-FR21	<u>QVQLVQSGAE</u>	<u>VKKPGSSVKV</u>	<u>SCKASGYIFT</u>	<u>TYNVHWVRQA</u>
AAB00780	<u>QVQLVQSGAE</u>	<u>VKKPGSSVKV</u>	<u>SCKASGGTFS</u>	<u>syaisWVRQA</u>
	5	a	6	7
	1234567890	12234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	<u>PGQGLEWIGS</u>	<u>IYPDNGDTSYN</u>	<u>QNFKGKATLT</u>	<u>ADKSSSTAYI</u>
HuGAL-FR21	<u>PGQGLEWIGS</u>	<u>IYPDNGDTSYN</u>	<u>QNFKGRATIT</u>	<u>ADKSTSTAYM</u>
AAB00780	<u>PGQGLEWMGg</u>	<u>iipifgtanya</u>	<u>qkfqgRVTIT</u>	<u>ADKSTSTAYM</u>
	abc	9	10	11
	1222234567890	1234567890	1234567890	123
GAL-FR21	<u>QLSSLTSEDSAVY</u>	<u>YCARGDF</u>	<u>AYWQGTLVT</u>	<u>VSV</u>
HuGAL-FR21	<u>ELSSLRSEDVAVY</u>	<u>YCARGDF</u>	<u>AYWQGTLVT</u>	<u>VSS</u>
AAB00780	<u>ELSSLRSEDVAVY</u>	<u>YCARgstvttgdf</u>	<u>dYWQGTLVT</u>	<u>VSS</u>

FIGURA 13

A

```

1          DIQMTQSSPSS
11  LSASVGD RVTITC KASQGV SN DVAWYQQQK P
41  GKAPKLLIYSAS YRYTGVPSRFS GSGSGT D
71  FTFTISSLQPE DIATY YCQQHSTT P YTFGQ
101 GTKLEIK RTVAA P SVFIF PPSDEQLKSGTA
131 SVVCLLN NFPY P REAKVQWKVDNALQSGNSQ
161 ESVTEQDSK DSYSLSS TLTLSKADY EKHK
191 VYACEVTH QGLSSP VTKS FN R GEC
    
```

B

```

1          QVQLVQSGAEVK
13  KPGSSSVKVSCKASGYIF TTYNVHWV RQAPG
43  QGLEWIGSIYFDNGDTSY NQNFKGRATITA
73  DKSTSTAYMELSSSLRSEDTAVY YCARGDFA
103 YWGGQGT LVTVSS ASTKGP SVFP LAPSSKST
133 SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS
163 GVHTFP PAVLQSSGLYSLS SVVTV PSSLGT
193 QTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHT
223 CFPFP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
253 TPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVVH
283 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLN
313 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKG QPRE
343 PQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
373 DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF
403 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
433 YTQKSLSLSPGK
    
```

FIGURA 14

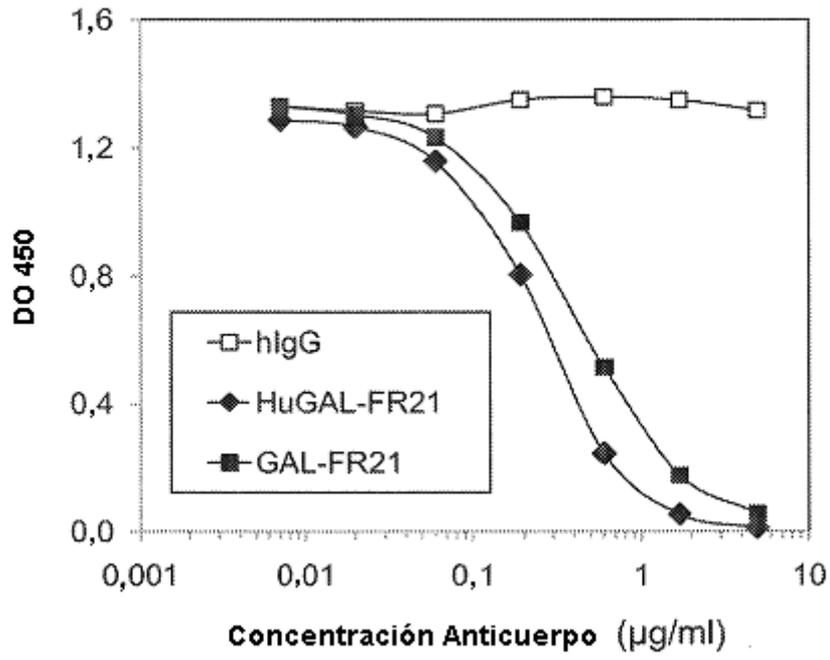


FIGURA 15

ES 2 646 168 T3

A

	1	2	3	4
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR22	DIQMTQSPSS	LSASLGGRVT	ITCKASQDIK	NYIAWYQHKP
	5	6	7	8
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR22	GKSPRLLIHY	TSTLQPGVPS	RFSGSGSGRD	YSFSISNLEP
	9	10		
	1234567890	1234567890	1234567	
GAL-FR22	EDIATYYCLQ	YDDLIM FGG	GTKLDIK	

B

	1	2	3	4
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR22	QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT	SFGVHWVRQS
	5	6	7	8
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR22	PGKGLEWLV	IWSGGSTDYN	ADFRSRLSIS	KDNSKSQIFF
	abc	9	10abcd	11
	1222234567890	12345678900000	1234567890	123
GAL-FR22	KMNSLQDDTAIY	YCANFYGYDDYVM	DYWGQGTSVT	VSS

FIGURA 16