



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2365828 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.01.19
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.10.15
(86)	Europeisk søknadsnr	09825523.5
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.11.06
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.09.21
(30)	Prioritet	2008.11.07, US, 112686 P 2009.03.30, US, 164870 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Galaxy Biotech, LLC, 22830 San Juan Road, Cupertino, CA 95014, US-USA
(72)	Oppfinner	KIM, Kyung Jin, 22830 San Juan Road, Cupertino, California 95014, US-USA ZHAO, Wei-Meng, 3440 Ramona Street Apt. 2, Palo AltoCalifornia 94306, US-USA PARK, Hangil, 1325 Indiana Street, 102, San FranciscoCalifornia 94107, US-USA VASQUEZ, Maximiliano, 3813 Louis Road, Palo AltoCA 94303, US-USA
(74)	Fullmektig	Jesper Levin A/S, Enrum Slot, Vedbæk Strandvej 341, DK-2950 VEDBÆK, Danmark

(54)	Benevnelse	Monoklonale antistoffer mot fibroblastvekstfaktorreseptor 2
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2007 248 605 WEI PING ET AL: "Generation and characterization of monoclonal antibodies to human keratinocyte growth factor receptor", HYBRIDOMA, vol. 25, no. 3, June 2006 (2006-06), pages 115-124, XP002673993, ISSN: 1554-0014 DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding", IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292, ISSN: 1380-2933, DOI: 10.1016/S1380-2933(96)00045-0 HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007 MCKAY BROWN ET AL: "Tolerance to single, but not multiple, amino acid replacements in antibody V-H CDR2: A means of minimizing B cell wastage from somatic hypermutation?", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 156, no. 9, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 3285-3291, XP002649029, ISSN: 0022-1767 MASAYUKI TAKEDA ET AL: "AZD2171 Shows Potent Antitumor Activity Against Gastric Cancer Over- Expressing Fibroblast Growth Factor Receptor 2/Keratinocyte Growth Factor Receptor", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 13, no. 10, 15 May 2007 (2007-05-15), pages 3051-3057, XP008138953, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2743

ZHAO WEI-MENG ET AL: "Monoclonal Antibodies to Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Effectively Inhibit Growth of Gastric Tumor Xenografts", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 16, no. 23, December 2010 (2010-12), pages 5750-5758, XP002673994, ISSN: 1078-0432
TAKEDA ET AL.: 'AZD2171 Shows Potent Antitumor Activity Against Gastric Cancer Over-Expressing Fibroblast Growth Factor Receptor 2/Keratinocyte Growth Factor Receptor.' CLIN CANCER RES. vol. 13, no. 10, 2007, pages 3051 - 3057, XP008138953
OGLE ET AL.: 'Regulation of Cranial Suture Morphogenesis.' CELLS TISSUES ORGANS vol. 176, no. 1-3, 2004, pages 54 - 66, XP008138976

Beskrivelse

MEDDELELSE OM STATLIG INTERESSE

[0001] Oppfinnelsen som beskrives i denne søknad, ble delvis utarbeidet med midler tilveiebrakt av Grant 5R44 CA101283-03 fra National Institutes of Health. Den amerikanske stat har visse rettigheter i denne oppfinnelse.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0002] Den foreliggende oppfinnelse angår generelt kombinasjonen av monoklonalt antistoff (mAb) og rekombinante DNA-teknologier med henblikk på utvikling av hittil ukjente bioteknologiske produkter, og nærmere bestemt for eksempel produksjonen av monoklonale antistoffer som binder til og nøytraliserer fibroblastvekstfaktorreseptor 2 (FGFR2).

BAKGRUNNEN FOR OPPFINNELSEN

[0003] Det er 22 kjente medlemmer av fibroblastvekstfaktor-familien (FGF-familien), idet de varierer i størrelse fra 17 til 34 kDa og deler en intern kjerneregion av similaritet, som kan grupperes inn i 7 underfamilier basert på deres similaritet i aktivitet og sekvens (Ornitz et al., Genome Biol. 2:3005.1, 2001). Eksempelvis består FGF1-undergruppen av de prototypiske FGF-er, FGF1 (sur FGF) og FGF2 (basisk FGF); FGF4-undergruppen består av FGF4, FGF5 og FGF6; og FGF7-underfamilien består av FGF3, FGF7, FGF10 og FGF22 (Zhang et al., J. Biol. Chem. 281:15694, 2006).

[0004] Én form for FGF2 er et 18 kDa ikke-glykosylert polypeptid bestående av 146 aminosyrer avledet fra en 155 aa-prekursor (Ornitz et al., Genome Biol. 2:3005.1, 2001;

Okada-Ban et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32:263, 2000). Et eksempel på en sekvens for en human 146 aminosyre-FGF2 er tilveiebrakt i SEQ ID NO:4 i US20020115603. I motsetning til de fleste andre FGF-er, koder FGF2 ikke for en signalsekvens for sekresjon, men 18 kDa-formen kan skilles ut av en ikke-konvensjonell energiavhengig vei uavhengig av ER-Golgi-komplekset. Det andre medlemmet av FGF1-underfamilien, selve FGF1, har størrelse og struktur som ligner FGF2, og mangler også en signalsekvens, men kan skilles ut. En annen FGF av interesse her er FGF7, også benevnt keratinocyt-vekstfaktor (KGF), som produseres av celler av mesenkymal opprinnelse og stimulerer epitelcelleproliferasjon (Finch et al., *Adv. Cancer Res.* 91:69, 2004; Finch et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 98:812, 2006). KGF uttrykkes i et antall organer, herunder lunge, prostata, bryst, fordøyelseskanal og hud, og er innblandet i organutvikling og reparasjon av kutane sår (Cho et al., *Am. J. Pathol.* 170:1964, 2007).

[0005] Medlemmene i FGF-familien binder til kun fire kjente tyrosinkinasereseptorer, fibroblastvekstfaktorreseptorer 1-4 (FGFR1-4) og deres isoformer, idet de ulike FGF-er binder de forskjellige FGFR-er i varierende grad (Zhang et al., *J. Biol. Chem.* 281:15694, 2006). En proteinsekvens av human FGFR2 er tilveiebrakt f.eks. i GenBank Locus AF487553. Hver FGFR består av et ekstracellulært domene (ECD) som omfatter tre immunoglobulin-lignende (Ig-lignende) domener (D1, D2 og D3), en enkelt transmembranelik, og et intracellulært katalytisk kinasedomene (Mohammadi et al., *Cytokine Growth Factor Revs*, 16:107, 2005) som vist i fig. 1. Det er et tilgrensende spenn av sure aminosyrer i linkerene mellom D1 og D2 som benevnes "acid box" (AB). Regionen som inneholder D1 og AB, antas å være involvert i autoinhiberingen av reseptoren, som avlastes ved binding til ligand. FGFR-ene kjennetegnes ved multippel alternativ spleising av deres mRNA-er, noe som resulterer i en mangfoldighet av isoformer (Ornitz et al., *J. Biol. Chem.* 271:15292, 1996; se også Swiss-Prot P21802 og isoformer P21802-1 til -20 for sekvenser av FGFR2 og dets isoformer). Spesielt finnes det former som inneholder alle tre Ig-domener (α -isoform) eller kun de to Ig-domenene D2- og D3-domener uten D1 (β -isoform). Av særlig betydning i FGFR1 - FGFR3, selv om alle former inneholder den første halvdel av D3 betegnet IIIa, kan to alternative eksoner anvendes til den andre halvdel av D3, noe som resulterer i IIIb- og IIIc-formene. For FGFR2 betegnes disse henholdsvis FGFR2IIIb og FGFR2IIIc (eller bare FGFR2b og FGFR2c); de tilsvarende betaformer

betegnes FGFR2(beta)IIIb og FGFR2(beta)IIIc. FGFR2IIIb-formen av FGFR2 (også betegnet K-sam-II {Swiss-Prot viser til dette som K-sam-IIC1?}) (se Swiss-Prot P21802-18) er en høyaffinitetsreseptor for både FGF1 og KGF, mens FGFR2IIIc (også betegnet K-sam-I) (se Swiss-Prot P21820-5) binder både FGF1 og FGF2 godt, men binder ikke KGF (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:246, 1992). FGFR2IIIb er faktisk den eneste reseptor for KGF (Ornitz et al., 1996, *op. cit.*), og betegnes derfor også KGFR.

[0006] FGFR-ene og deres isoformer uttrykkes differensielt i ulike vev. Spesielt uttrykkes FGFR2IIIb (og IIIb-formene av FGFR1 og FGFR3) i epitelvev, mens FGFRIIIc uttrykkes i mesenkymale vev (Duan et al., J. Biol. Chem. 267:16076, 1992; Ornitz et al., 1996, *op. cit.*). Visse av FGF-ligandene av disse reseptorer kan ha et motsatt ekspresjonsmønster. Således binder medlemmer av FGF3-underfamilien, herunder FGF7 (KGF), kun til FGFRIIIb (Zhang et al., *op. cit.*) og uttrykkes i mesenkymale vev og kan således være parakrine effektorer av epitelceller (Ornitz et al., 1996, *op. cit.*). I kontrast binder medlemmene av FGF4-underfamilien FGF4-6 til FGFR2IIIc og uttrykkes i både epitele og mesenkymale avstamninger, og kan således ha enten autokrine eller parakrine funksjoner. På grunn av ekspresjonsmønstrene til isoformene av FGFR2 og deres ligander, spiller FGFR2 en rolle i epitel-mesenkymale interaksjoner (Finch et al., Dev. Dyn. 203:223, 1995), så det er ikke overraskende at knock-out av FGFR2IIIb hos mus fører til alvorlige embryonale defekter og letalitet (De Moerlooze et al., Development 127:483, 2000).

[0007] I tillegg til å binde FGFR1-4 med høy affinitet, binder FGF-ene til heparinsulfatproteoglykaner (HSPG) med lavere affinitet. Binding av FGF til heparin/heparinsulfat (HS) på celleoverflaten er faktisk nødvendig for signalering gjennom FGFR-ene. Interaksjonen av FGF, især FGF2, med FGFR og heparin, har blitt grundig undersøkt ved røntgenkrystallografi og mutasjonanalyse, og det antas nå at heparin/HS tar del i dannelsen av en symmetrisk 2:2 FGF-FGFR-dimer (Mohammadi et al., 2005), noe som fører til reseptoraktivering, autofosforylering og signaltransduksjon.

[0008] FGF-ene medierer en mangfoldighet av responser i ulike celletyper, herunder proliferasjon, migrasjon og differensiering, især under embryonal utvikling (Ornitz et al., *op. cit.*), og er hos voksne involvert i vevshomeostase og -reparasjon. Eksempelvis stimulerer

FGF2 proliferasjon av (dvs. er mitogent for) visse celler, herunder fibroblaster og endotelceller, og er en anti-apoptotisk overlevelsesfaktor for visse celler, slik som nerveceller (Okada-Ban, *op. cit.*). FGF2 stimulerer også differensiering (morfogenese) og migrasjon (motilitet) av endotelceller (Dow et al., *Urology* 55:800, 2000). Flere FGF-er, især FGF1 og FGF2, er potente angiogene faktorer (Presta et al., *Cytokine and Growth Factor Rev.* 16:159, 2005).

[0009] FGF-systemets betydning i utvikling har blitt understreket ved oppdagelsen av tallrike mutasjoner i FGFR1-3 assosiert med kongenitale skjelettlidelser hos mennesker, herunder kraniosynostosesyndromene (prematur fusjon av skallesømmen) (Wilkie et al., *Cytokine Growth Factor Revs* 16:187, 2005). Disse genetiske sykdommene er vanligvis dominante, ettersom de assosierte mutasjoner fører til gain-of-function, ofte ved å muliggjøre reseptordimerisering. Spesielt er den alvorlige kraniosynostoselidelsen Apert syndrom (AS) assosiert med én av to mutasjoner (Ser-252 -> Trp eller Pro-253 -> Arg) i den bevarte D2-D3 linkerregionen av FGFR2 som øker ligandbindingaffinitet (Ibrahimi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98:7182, 2001).

[0010] Det har blitt rapportert at FGF2 og andre FGF-er spiller en rolle i kreft, både ved å stimulere angiogenese og tumorceller direkte (Grose et al., *Cytokine Growth Factor Revs.* 16:179, 2005; Presta et al., *op cit.*). FGFR2IIIb RNA uttrykkes i mange tumortyper (Finch et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 98:812, 2006), ofte som en konsekvens at dets ekspresjon i de tilsvarende normale vev (Orr-Urtreger et al., *Dev. Biol.* 158:475, 1993). KGF (FGF7) og KGFR (FGFR2IIIb) er overuttrykt i mange pankreaskrefttyper (Ishiwata et al., *Am. J. Pathol.* 153: 213, 1998), og deres co-ekspresjon korrelerer med dårlig prognose (Cho et al., *Am. J. Pathol.* 170:1964, 2007). Somatiske mutasjoner av FGFR2-genet ble funnet hos 12% i et stort panel av endometriale (uterine) karsinomer, og var i flere testede tilfeller nødvendig for tumorcelleoverlevelse (Dutt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:8713, 2008). I to tumorer viste det seg at FGFR2-mutasjonen var den samme S252W-substitusjon som assosieres med Apert syndrom. Amplifikasjon og overekspresjon av FGFR2 er sterkt assosiert med den udifferensierte, diffuse type magekreft som har en særlig dårlig prognose, og inhibering av FGFR2-aktiviteten ved hjelp av små molekyforbindelser inhiberte potent proliferasjon av slike kreftceller (Kunii et al., *Cancer*

Res. 68:2340, 2008; Nakamura et al., Gastroenterol. 131:1530, 2006). FGFR2IIIb RNA ble uttrykt i 16/20 epiteliale eggstokkrefttyper (EOC-er), men ikke i alminnelig ovarieoverflateepitel (Steele et al., Oncogene 20:5878, 2001); og FGFR2IIIb-ligandene FGF1, FGF7 og FGF10 induserte proliferasjon, motilitet og beskyttelse mot celledød i EOC-cellelinjer (Steele et al., Growth Factors 24:45, 2006), hvilket antyder at FGFR2IIIb kan bidra til den maligne fenotype i eggstokkreft.

[0011] Kun et begrenset antall monoklonale antistoffer til FGFR2 har blitt rapportert. Fortin et al. (J. Neurosci. 25:7470, 2005) rapporterte et blokkerende antistoff til FGFR2, og Wei et al. (Hybridoma 25: 115, 2006) utviklet to muse-mAb-er spesifikt til IIIb-formen av FGFR2 (dvs. KGFR) som inhiberte KGF-indusert celleproliferasjon. Wei et al. beskriver ikke antistoffet GAL-FR21.

I US 2007/248605A1 drøftes ulike antistoffer som binder til ulike FGF-reseptorer. I US 2007/248605A1 beskrives GAL-FR21-antistoffet ikke. I Yayon et al. (WO2007/144893, 2006) beskrives et inhiberende mAb som binder både FGFR2 og FGFR3. R&D Systems har siden 2005 markedsført et anti-FGFR2 mAb som nøytraliserer aktivitet i deres assay, med preferanse for IIIb-formen. Det har imidlertid ikke vært noen rapporter om anti-tumoraktivitet av antistoffer mot FGFR2 *in vivo*.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0012] Beskrivelsen tilveiebringer et monoklonalt antistoff (mAb) til human fibroblastvekstfaktorreseptor 2 (FGFR2) som inhiberer vekst av en human tumorxenograft hos en mus. mAb-et kan inhibere i det minste én og fortrinnsvis flere eller alle reseptorens biologiske aktiviteter, herunder binding til reseptoren av FGF2. mAb-et kan binde til en av eller begge av reseptorens FGFR2IIIb- og FGFRIIIC-former, f.eks. til FGFR2IIIb, men ikke til FGFR2IIIC mAb-et kan være genmanipulert, for eksempel kimært, humanisert eller humant. Eksempler på antistoffer er GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 og deres kimære og humaniserte former, samt mAb-er som har den samme epitop eller konkurrere om binding med ett av disse mAb-ene. Det beskrives også en farmasøytisk sammensetning som omfatter et genmanipulert anti-FGFR2-antistoff, f.eks. tilveiebringes

kimært eller humanisert GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23. Den farmasøytiske sammensetning kan administreres til en pasient for å behandle kreft eller en annen sykdom, for eksempel magekreft.

[0013] Eksempler på humaniserte antistoffer omfatter en humanisert lettkjede som omfatter CDR-er fra sekvensen i fig. 13A (GAL-FR21) og en humanisert tungkjede som omfatter CDR-er fra sekvensen i fig. 13B (GAL-FR21), eller omfatter en humanisert lettkjede som omfatter CDR-er fra sekvensen i fig. 16A (GAL-FR22) og en humanisert tungkjede som omfatter CDR-er fra sekvensen i fig. 16B (GAL-FR22). Noen humaniserte antistoffer omfatter de tre lettkjede-CDR-er som er vist i fig. 13A (GAL-FR21) og de tre tungkjede-CDR-er som er vist i fig. 13B (GAL-FR21), eller omfatter de tre lettkjede-CDR-er som er vist i fig. 16A (GAL-FR22) og de tre tungkjede-CDR-er som er vist i fig. 16B (GAL-FR22). Den variable lettkjede-region har eventuelt i det minste 95% sekvensidentitet med den i fig. 13A viste sekvens (HuGAL-FR21), og den variable tungkjede-region har i det minste 95% sekvensidentitet med den i fig. 13B viste sekvens (HuGAL-FR21). I noen slike antistoffer inntas rester H27, H28, H30, H48 og H67 ved Kabat-nummerering av den rest som inntar den tilsvarende posisjon til den i fig. 13B viste tungkjede (GAL-FR21). Et foretrukket humanisert antistoff omfatter en variabel lettkjede-region som har den i fig. 13A viste sekvens (HuGAL-FR21) og en variabel tungkjede-region som har den i fig. 13B viste sekvens (HuGAL-FR21).

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0014]

Figur 1. Skjematisk diagram over FGFR2's struktur, som viser de tre Ig-lignende domener (D1, D2 og D3), transmembrandomene (svart boks), og intracellulært kinasedomene. Det heparinbindende sted (HBS), Acid Box (AB) og alternative delvise IIIb/IIIc-domener er angitt. N = aminoterminal, C = karboksyterminal.

Figur 2. Oppsummering av egenskaper til anti-FGFR2 mAb-ene GAL-FR21, GAL-FR22, GAL-FR23 som beskrevet under eksempler.

Figur 3. Binding-ELISA av mAb-er GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 og negativ kontroll mlgG til FGFR2IIIb.

Figur 4. Binding-ELISA av mAb-er GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 og negativ kontrollmus mAb 5G8 til hver av de fire formene av FGFR2-FGFR2IIIb, FGFR2(beta)IIIb, FGFR2(IIIc) og FGFR2(beta)IIIc – som fusjonsproteiner med Fc. En fast konsentrasjon av hvert mAb ble anvendt i assayet.

Figur 5. Kompetitivt binding-ELISA til FGFR2IIIb av hver av mAb-ene GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 og negativ kontrollmus mAb 5G8 mot mAb-ene i biotinyleret form. Det ble anvendt et forhold på 100:1 av ikke-markert i forhold til biotinyleret mAb.

Figur 6. Væskestrømscytometri av binding av mAb-ene GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 og negativ kontroll mAb til FGFR2IIIb på SNU-16- og KATO III-celler.

Figur 7. Væskestrømscytometri av mAb-ene GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 og negativ kontroll mAb bindende til 293F-celler transfektert med FGFR2IIIc eller FGFR2IIIb(S252W).

Figur 8. (A) ELISA-assay som måler inhibering av binding av FGF1 (øvre panel) og FGF2 (nedre panel) i forhold til FGFR2IIIb av mAb-er GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23. (B) ELISA-assay som måler inhibering av binding av FGF7 (øvre panel) og FGF10 (nedre panel) i forhold til FGFR2IIIb av mAb-er GAL-FR21, GAL-FR22.

Figur 9. Vekst av SNU-16 humane gastrisk tumor-xenografter hos mus behandlet med PBS alene, GAL-FR21, GAL-FR23 eller FR2bC 54.8.11 (øvre panel) eller med PBS, GAL-FR22 eller FR2bC 54.8.11 (nedre panel). mAb-ene ble administrert ved 20 µg to ganger i uka, cirka 5 mus per gruppe.

Figur 10. Vekst av SNU-16 (A, øvre panel) eller OCUM-2M (B, nedre panel) humane gastrisk tumor-xenografter hos mus behandlet med PBS alene, GAL-FR21 eller GAL-FR22.

Figur 11. Binding-ELISA av GAL-FR21 (øvre panel) eller GAL-FR22 (nedre panel) til human og muse-FGFR2IIIb.

Figur 12. Binding-ELISA av GAL-FR21 (øvre panel) eller GAL-FR22 (nedre panel) til human og krabbemakak-FGFR2IIIb.

Figur 13. Aminosyresekvenser av HuGAL-FR21-leddkjedens (A) og tungkjedens (B) modne variable regioner er vist på linje med muse-GAL-FR21 og humane akseptor V-regioner. CDR-ene er understreket i GAL-FR21-sekvensene, og aminosyrene som er substituert med museaminozyrer, er dobbelt understreket i HuGAL-FR21-sekvensene. 1-bokstav-aminosyrekoden og Kabat-nummereringssystemet anvendes for både lett- og tungkjeden.

Figur 14. Aminosyresekvenser av hele det modne HuGAL-FR21-antistoffs lettjede (A) og tungjede (B). Den første aminosyre på hver linje er nummerert; nummereringen er sekvensiell. I lettjeden er C_κ-regionens første aminosyre understreket, og i tungjeden er de første aminosyrer av CH1-, hengsel-, CH2- og CH3-regionene understreket.

Figur 15. Kompetitiv binding av humanisert HuGAL-FR21 og muse-GAL-FR21 mAb-er og kontroll humant antistoff hlgG, gjennomført som beskrevet i spesifikasjonen.

Figur 16. Aminosyresekvenser av HuGAL-FR22-leddkjedens (A) og tungkjedens (B) variable modne regioner, med CDR-ene understreket. 1-bokstav-aminosyrekoden og Kabat-nummereringssystemet anvendes for både lett- og tungkjeden.

DETALJERT BESKRIVELSE

[0015] Beskrivelsen tilveiebringer anti-FGFR2 monoklonale antistoffer (mAb-er) som inhiberer biologiske aktiviteter av FGFR2 og/eller inhiberer vekst av en FGFR2-

uttrykkende tumorxenograft i en mus, farmasøytiske sammensetninger som omfatter mAb-ene, og fremgangsmåter for anvendelse av disse i behandlingen av sykdom.

1. Antistoffer

[0016] Antistoffer er svært store, komplekse molekyler (molekylvekt på ~150 000 eller cirka 1320 aminosyrer) med intrikat intern struktur. Et naturlig antistoffmolekyl inneholder to identiske par av polypeptidkjeder, idet hvert par har én lettjede og én tungjede. Hver lettjede og hver tungjede består på sin side av to regioner: en variabel ("V") region som er involvert i binding av målantigenet, og en konstant ("C") region som samvirker med øvrige komponenter i immunsystemet. Lett- og tungkjedenes variable regioner kommer sammen i 3-dimensjonalt rom for å danne en variabel region som binder antigenet (for eksempel en reseptor på overflaten av en celle). I hver lett- eller tungkjedes variable region er det tre korte segmenter (med en gjennomsnittslengde på 10 aminosyrer) som benevnes de komplementaritetsbestemmende regioner ("CDR-er"). De seks CDR-er i et variabelt antistoffdomene (tre fra lettjeden og tre fra tungjeden) folder opp sammen i tredimensjonalt rom for å danne det faktiske antistoffbindende sted som låser over på målantigenet. CDR-enes posisjon og lengde har blitt nøyaktig definert av Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987. Den delen av en variabel region som ikke inneholdes i CDR-ene, kalles rammeverket, som utgjør CDR-enes miljø.

[0017] Et humanisert antistoff er et genmodifisert antistoff hvor CDR-ene fra et museantistoff ("donorantistoff", som også kan være en rotte, en hamster eller en annen ikke-menneskelig art) podes over på et humant antistoff ("akseptor-antistoff"). Akseptor-antistoffets sekvens kan for eksempel være en moden human antistoffsekvens, en konsensussekvens av humane antistoffsekvenser, eller en kimbaneregionsekvens. Således er et humanisert antistoff et antistoff som har CDR-er fra et donorantistoff og variabel region-rammeverk og konstante regioner fra et humant antistoff. I tillegg, for å bibeholde høy bindingsaffinitet, kan i det minste én av to ytterligere strukturelle elementer benyttes. Se US-patent nr. 5,530,101 og 5,585,089, som tilveiebringer detaljerte instruksjoner

for konstruksjon av humaniserte antistoffer. Selv om humaniserte antistoffer ofte inkorporerer alle seks CDR-er (fortrinnsvis som definert av Kabat, men alternativt ved hjelp av andre definisjoner, slik som Chothias) fra et museantistoff, kan de også tillages med mindre enn de komplette CDR-er fra et museantistoff (f.eks. 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).

[0018] Likeledes kan det være nødvendig å inkorporere kun en del av CDR-ene, nemlig delmengden av CDR-rester som er påkrevet for binding, benevnt SDR-ene, i det humaniserte antistoff. CDR-rester som ikke kontakter antigen og ikke i SDR-ene kan identifiseres basert på tidligere studier (for eksempel er rester H60-H65 i CDRH2 ofte ikke påkrevet), fra regioner av Kabat CDR-er som ligger utenfor Chothia hypervariable sløyfer (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), ved hjelp av molekylær modellering og/eller empirisk, eller som beskrevet i Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. I slike humaniserte antistoffer ved posisjoner hvori én eller flere donor-CDR-rester er fraværende, kan aminosyren som inntar posisjonen, være en aminosyre som inntar den tilsvarende posisjon (ved Kabat-nummerering) i akseptor-antistoffsekvensen. Antallet av slike substitusjoner som skal innbefattes, gjenspeiler en balanse av konkurrerende betraktninger. Slike substitusjoner er potensielt fordelaktige ved at de senker antallet muse-aminosyrer i et humanisert antistoff og følgelig ved å senke potensiell immunogenisitet. Substitusjoner kan imidlertid også bevirke endringer i affinitet, og det foretrekkes at signifikante reduksjoner i affinitet unngås. Posisjoner for substitusjon i CDR-er og aminosyrer som skal substitueres, kan også selekteres empirisk.

[0019] Således omfatter et humanisert antistoff typisk (i) en lettkjede som omfatter CDR-er (ofte tre CDR-er) fra et museantistoff, f.eks. GAL-FR21, et variabelt human region-rammeverk, og en konstant human region; og (ii) en tungkjede som omfatter CDR-er (ofte tre CDR-er) fra museantistoffet, f.eks. GAL-FR21, et variabelt human region-nettverk og en konstant human region. De variable lett- og tungkjede-region-rammeverkene kan hver være en moden human antistoffsekvens, en konsensussekvens av humane antistoffsekvenser, eller en kimbaneregionsekvens.

[0020] I det første strukturelle element velges den variable tungkjederegions rammeverk av det humaniserte antistoff til å ha maksimal sekvensidentitet (mellom 65% og 95%) med den variable tungkjederegions rammeverk av donor-antistoffet, ved passende å selekttere akseptor-antistoffet blant de mange kjente humane antistoffer. I det andre strukturelle element, under konstruksjonen av det humaniserte antistoff, utskiftes selekterte aminosyrer i det humane akseptorantistoff (utenfor CDR-ene) med tilsvarende aminosyrer fra donorantistoffet i overensstemmelse med spesifiserte regler. Nærmere bestemt velges aminosyrene som skal utskiftes i rammeverket, på grunnlag av deres evne til å interagere med CDR-ene. Eksempelvis kan de utskiftede aminosyrer være naboliggende en CDR i donorantistoffsekvensen eller innenfor 4-6 ångstrøm av en CDR i det humaniserte antistoff som målt i 3-dimensjonalt rom.

[0021] Et kimært antistoff er et antistoff hvori den variable region av en mus' (eller annen gnagers) antistoff kombineres med et humant antistoffs konstante region; deres konstruksjon ved hjelp av genteknologi er velkjent. Slike antistoffer bibeholder museantistoffets bindingsspesifisitet, værende omkring totredels human. Proporsjonen av ikke-human sekvens til stede i museantistoff, kimært antistoff og humanisert antistoff antyder at kimære antistoffers immunogenisitet ligger mellom museantistoffer og humaniserte antistoffer. Andre typer genmodifiserte antistoffer som kan ha redusert immunogenisitet i forhold til museantistoffer, innbefatter humane antistoffer som er tillaget under anvendelse av fagvisningsfremgangsmåter (Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791 ; og Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998) eller under anvendelse av transgene dyr (Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741.

[0022] Som anvendt heri viser uttrykket "menneskelignende" antistoff til et mAb hvor en vesentlig del av aminosyresekvensen i én eller begge kjeder (f.eks. cirka 50% eller mer) har sitt oppgav i humane immunoglobuliner. Menneskelignende antistoffer omfatter derfor, men er ikke begrenset til, kimære, humaniserte og humane antistoffer. Som anvendt heri er et mAb med " redusert-immunogenisitet" ett som forventes å ha betydelig mindre immunogenisitet enn et museantistoff når administrert til humane pasienter. Slike

antistoffer omfatter kimære, humaniserte og humane mAb-er så vel som mAb-er som er tillaget ved å utskifte spesifikke aminosyrer i museantistoffer som kan bidra til B- eller T-celleepitoper, for eksempel eksponerte rester (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). Som anvendt heri er et "genmodifisert" mAb ett for hvilket genene har blitt konstruert eller anbrakt i unaturlige omgivelser (f.eks. humane gener i en mus eller på en bakteriofag) ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker, og vil derfor f.eks. ikke omfatte et muse-mAb som er tillaget med konvensjonell hybridomteknologi.

[0023] Andre tilnærminger for å designe humaniserte antistoffer kan også anvendes for å oppnå det samme resultat som fremgangsmåtene i de ovenfor beskrevne US-patent nr. 5,530,101 og 5,585,089, for eksempel "superhumanisering" (se Tan et al. J. Immunol. 169: 1119, 2002, og US-patent nr. 6,881,557) eller fremgangsmåten i Studnicak et al., Protein Eng. 7:805, 1994. Videre innbefatter andre tilnærminger for å produsere genomodifiserte mAb-er med redusert immunogenisitet "omforming" (reshaping), "hyperkimerisering" (hyperchimerization) og overflatebehandling/overflateombygging (veneering/resurfacing) som beskrevet f.eks. i Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma and Immunology 81:105, 1998; Roguska et al. Protein Eng. 9:895, 1996; og US-patent nr. 6,072,035 og 5,639,641.

[0024] Epitopen av et mAb er den region av detn antigen til hvilken mAb-et binder. To antistoffer binder til den samme eller overlappende epitop dersom hver kompetitivt inhiberer (blokkerer) binding av den annen til antigenet. Det vil si et overskudd på 1x, 5x, 10x, 20x eller 100x av ett antistoff inhiberer binding av det annet med i det minste 50%, men fortrinnsvis 75%, 90% eller til og med 99% som målt i et kompetitivt bindingsassay (se f.eks. Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Alternativt har to antistoffer den samme epitop dersom i all vesentlighet alle syremutasjoner i antigenet som reduserer eller eliminerer binding av ett antistoff, reduserer eller eliminerer binding av det annet. To antistoffer har overlappende epitoper hvis noen aminosyremutasjoner som reduserer eller eliminerer binding av ett antistoff, reduserer eller eliminerer binding av det annet.

2. Anti-FGFR2-antistoffer

[0025] Et monoklonalt antistoff (mAb) som binder FGFR2 (dvs. et anti-FGFR2-mAb), sies å nøytralisere FGFR2 eller å være nøytraliserende (eller inhibitorisk eller antagonist) dersom bindingen delvis eller fullstendig inhiberer én eller flere av FGFR2's biologiske aktiviteter. Blant FGFR2's biologiske aktiviteter som et nøytraliserende antistoff kan inhibere eller blokkere, er FGFR2's evne til å binde til én eller flere eller alle sine FGF-ligander, f.eks. FGF1 og/eller FGF2. For FGFRIIIb omfatter disse ligandene FGF1, FGF7 (KGF) og de andre medlemmene av FGF7-underfamilien FGF3, FGF10 og FGF22. For FGFRIIIc omfatter disse ligandene FGF1 og FGF2; FGF4 og de øvrige medlemmene av FGF4-underfamilien FGF5 og FGF6; FGF8 og de øvrige medlemmene av FGF8-underfamilien FGF17 og FGF18; og FGF9 og de øvrige medlemmene av FGF9-underfamilien FGF16 og FGF20. En annen viktig FGFR2-aktivitet som kan inhiberes av et nøytraliserende anti-FGFR2 mAb, er stimulering av proliferasjon av celler, f.eks. epitel- eller endotelceller, fibroblaster, celler slik som Ba/F3-celler inn i hvilke FGFR2 har blitt transfektert, og ulike humane tumorceller. Andre aktiviteter som kan inhiberes ved hjelp av et nøytraliserende anti-FGFR2 mAb, er stimulering av differensiering og migrering av celler slik som endotelceller, og induksjon av angiogenese, for eksempel som målt ved stimulering av human vaskulær endotelcelle (HUVEC)-proliferasjon eller rørdannelse eller ved induksjon av blodkar når anvendt på CAM (chick embryo chorioallantoic membrane). Vanligvis inhiberer det nøytraliserende mAb disse aktivitetene når indusert av én eller flere av de ovenfor anførte FGF-er. Likeledes inhiberer mAb-et fortrinnsvis alt eller del av signaltransduksjonsveien som stimuleres ved binding av en FGF-ligand til FGFR2 (Dailey et al., Cytokine Growth Factor Revs 16:233, 2005), f.eks. fosforylering av FGFR2 og nedstrøms MAP-kinaser.

[0026] Et nøytraliserende mAb ifølge oppfinnelsen ved en konsentrasjon på f.eks. 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 eller 50 g/ml inhiberer en biologisk funksjon av FGFR2 med cirka i det minste 50%, men fortrinnsvis 75%, mer foretrukket med 90% eller 95% eller til og med 99%, og mest foretrukket cirka 100% (i all vesentlighet fullstendig eller ikke mulig å skjelne fra en negativ kontroll som mangler FGFR2) som analysert ved hjelp av fremgangsmåter som beskrevet under eksempler eller som er kjente innenfor teknikken. Omfanget av inhibering måles typisk når mengden av FGF-ligand som anvendes, er akkurat tilstrekkelig

til fullt ut å stimulere den biologiske aktivitet, eller er 1, 2 eller 5 ng/ml eller 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 3 eller 10 g/ml. Det foretrekkes at mAb-et er nøytraliserende, dvs. inhiberer den biologiske aktivitet, når anvendt som et enkelt middel, men eventuelt kan 2 mAb-er anvendes sammen for å gi inhibering. Mest foretrukket nøytraliserer mAb-et ikke bare én, men to, tre eller flere av de ovenfor anførte biologiske aktiviteter; for formål heri benevnes et anti-FGFR2 mAb som anvendt som et enkelt middel nøytraliserer alle de biologiske aktiviteter av FGFR2, "fullt nøytraliserende", og slike mAb-er er mest foretrukket.

[0027] Beskrivelsen tilveiebringer nøytraliserende mAb-er som binder FGFR2IIIb, men binder mindre godt eller ikke detekterbart til FGFRIIIc, eller alternativt binder til FGFR2IIIc, men mindre godt eller ikke detekterbart til FGFRIIIb, eller i et tredje alternativ binder til både FGFR2IIIb og FGFR2IIIc, og anvendelsen av hvilke som helst av disse typer antistoffer i en farmasøytisk sammensetning, især til behandlingen av kreft eller andre sykdommer. Beskrivelsen tilveiebringer også mAb-er, enten nøytraliserende eller ikke-nøytraliserende, som binder FGFR2 i én eller flere av dets former og inhiberer, fortrinnsvis fullstendig, vekst av en tumorxenograft som uttrykker FGFR2, f.eks. en SNU-16- eller OCUM-2M-xenograft. Et slikt mAb kan inhibere tumorvekst ved f.eks. å sende et negativt vekstsignal eller et pro-apoptotisk signal gjennom FGFR2. Heri beskrevne MAb-er er fortrinnsvis spesifikke for FGFR2 eller binder det preferensielt, det vil si at de ikke binder, eller kun binder i et mye mindre omfang (f.eks. i det minste 10 ganger mindre), proteiner som er relatert til FGFR2, slik som de øvrige FGF-reseptorer FGFR1, FGFR3 og FGFR4 så vel som andre membran-reseptortyrosinkinaser. På den annen side foretrekkes i noen tilfeller mAb-er som binder én eller flere av de øvrige FGF-reseptorer i tillegg til FGFR2. Heri beskrevne MAb-er har typisk en bindingsaffinitet (assosiasjonskonstant K_a) for FGFR2 på i det minste 10^7 M^{-1} , men fortrinnsvis 10^8 M^{-1} eller høyere, og mest foretrukket 10^9 M^{-1} eller høyere, eller til og med 10^{10} M^{-1} eller høyere. Mab-er som fremviser differensiell eller preferensiell binding for én form for FGFR eller FGFR2 fremfor en annen, fremviser fortrinnsvis en preferanse på i det minste fem, ti eller hundre ganger mellom formene, f.eks. som målt ved K_a . Mangel på binding mellom et antistoff og antigen (dvs. antistoffet binder ikke antigenet) betyr at et hvilket som helst signal fra en forsøkt bindingsreaksjon mellom de to, ikke kan skjelnes fra en negativ kontroll, f.eks. hvor antistoff eller antigen er fraværende eller utskiftet med en inaktiv agens.

[0028] Noen heri beskrevne mAb-er binder både humant FGFR2 og muse-FGFR2, eller binder humant FGFR2 og én, to eller flere eller alle av muse-, rotte-, kanin-, kylling-, hund- og/eller ape- (f.eks. krabbemakak) FGFR2. I noen tilfeller binder mAb-et muse-FGFR2 (f.eks. muse-FGFR2IIIb) med en affinitet (dvs. K_a) innenfor 2, 10 eller 100 ganger av den til affiniteten for humant FGFR2; likeledes kan mAb-et binde krabbemakak- eller sjimpanse-FGFR2 (f.eks. FGFR2IIIb) med en affinitet innenfor 2 eller 10 ganger av den til affiniteten for humant FGFR2 eller til og med det samme som eller ikke skjelnbar fra humant FGFR2 (dvs. innenfor forsøksfeil). Andre mAb-er spesifikke for kun humant FGFR2.

[0029] Heri beskrevne MAb-er innbefatter anti-FGFR2-antistoffer i deres naturlige tetramerform (2 lett kjeder og 2 tungkjeder) og kan være av hvilke som helst av de kjente isotyper IgG, IgA, IgM, IgD og IgE og deres undertyper, dvs. human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 og muse-IgG1, IgG2a, IgG2b og IgG3. De heri beskrevne mAb-er innbefatter også fragmenter av antistoffer, slik som Fv, Fab og F(ab')₂; bifunksjonelle hybridantistoffer (f.eks. Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), enkeltkjedete antistoff (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); enkeltarm-antistoffer (Nguyen et al., Cancer Gene Ther. 10:840, 2003); og antistoffer med endrede konstante regioner (f.eks. US-patent nr. 5,624,821). mAb-ene kan være av animalsk (f.eks. mus, rotte, hamster eller kylling) opprinnelse, eller de kan være genmodifiserte. Gnager-mAb-er fremstilles ved hjelp av standardmetoder, idet de omfatter multipl immunisering med FGFR2 i egnet adjuvans i.p., i.v., eller i hefteskiven, etterfulgt av ekstraksjon av milt- eller lymfeknuteceller og fusjon med en passende immortalisert cellelinje, og deretter seleksjon for hybridomer som danner antistoffbinding til f.eks. FGFR2, se under eksempler. Kimære og humaniserte mAb-er, tillaget ved hjelp av ovenfor nevnte fremgangsmåter som er kjent innenfor teknikken, foretrekkes. Humane antistoffer tillaget f.eks. ved hjelp av fagvisning eller transgene mus-metoder er også foretrukne (se f.eks. Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, *supra*).

[0030] Anti-FGFR2-mAb-ene GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 beskrives nedenfor. Når en enkelt, arketypisk anti-FGFR2-mAb, for eksempel GAL-FR21, som har de heri

ønskede egenskaper av å nøytralisere FGFR2, har blitt isolert, er det ukomplisert å generere øvrige mAb-er med lignende egenskaper, f.eks. som har den samme epitop, under anvendelse av fremgangsmåter som er kjent innenfor teknikken. Eksempelvis kan mus immuniseres med FGFR2 som beskrevet ovenfor, hybridomer produseres, og de resulterende mAb-er screenes for evnen til å konkurrere med det arketypiske mAb om binding til FGFR2. Mus kan også immuniseres med et mindre fragment av FGFR2 som inneholder den epitop til hvilken det arketypiske mAb binder. Epitopen kan lokaliseres, f.eks. ved å screene for binding til en serie av overlappende peptider som omspinner FGFR2. Alternativt kan fremgangsmåten til Jespers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994 anvendes som veiledning til seleksjonen av mAb-er som har den samme epitop og derfor lignende egenskaper som det arketypiske mAb, f.eks. GAL-FR21. Under anvendelse av fagvisning pares først det arketypiske antistoffs tungkjede med et repertoar av (fortrinnsvis humane) lettkjeder for å selekttere et FGFR2-bindende mAb, og deretter pares den nye lettkjede med et repertoar av (fortrinnsvis humane) tungkjeder for å selekttere et (fortrinnsvis humant) FGFR2-bindende mAb som har den samme epitop som det arketypiske mAb. Alternative varianter av f.eks. GAL-FR21 kan oppnås ved mutagenese av cDNA som koder for tung- og lettkjedene av GAL-FR21.

[0031] MAb-er med den samme eller overlappende epitop som GAL-FR21, GAL-FG22 eller GAL-FR23, f.eks. som konkurrerer om binding til FGFR2 med det respektive mAb, tilveiebringer andre eksempler. En kimær eller humanisert form av GAL-FR21, GAL-FG22 eller GAL-FR23 er et særlig foretrukket eksempel. MAb-er som er 90%, 95% eller 99% identiske med GAL-FR21, GAL-FG22 eller GAL-FR23 i aminosyresekvens av de variable tung- og/eller lettkjederegioner (idet signalsekvensen ikke inkluderes) og opprettholder sine funksjonelle egenskaper, og/eller som er forskjellig fra det respektive mAb med et lite antall funksjonelt inkonsekvensielle aminosyresubstitusjoner (f.eks. konservative substitusjoner), delesjoner eller insersjoner beskrives også heri. MAb-er som har i det minste én og fortrinnsvis alle seks CDR(er) som er 90%, 95% eller 99% eller 100% identiske med tilsvarende CDR-er av GAL-FR21, GAL-FG22 eller GAL-FR23, beskrives også. Her, som ellers i denne beskrivelse, bestemmes prosentandel sekvensidentiteter med antistoffsekvenser som er maksimalt tilpasset ved hjelp av Kabat-nummereringskonvensjonen. Etter tilpasning, dersom en aktuell antistoffregion (f.eks. hele

den variable regionen av en tung- eller lettkjede) sammenlignes med den samme region av et referanseantistoff, er prosentandelen sekvensidentitet mellom de aktuelle antistoffregioner og referanseantistoff-regioner det antall posisjoner som inntas av den samme aminosyre i både den aktuelle region og referanseantistoffregionen dividert med det totale antall justerte posisjoner for de to regioner, idet mellomrom ikke telles, multiplisert med 100 for å omdanne til prosent.

[0032] Med hensyn til klassifisering av aminosyresubstitusjoner som konservative eller ikke-konservative, kan aminosyrer grupperes som følger: Gruppe I (hydrofobiske sidekjeder); met, ala, val, leu, ile; gruppe II (nøytrale hydrofile sidekjeder): cys, ser, thr; gruppe III (sure sidekjeder): asp, glu; gruppe IV (basiske sidekjeder): asn, gln, his, lys, arg; gruppe V (rester som innvirker på kjedekonformasjon): gly, pro; og gruppe VI (aromatiske sidekjeder): trp, tyr, phe. Konservative substitusjoner involverer substitusjoner mellom aminosyrer i den samme gruppe. Ikke-konservative substitusjoner utgjør utveksling av et element i én av disse gruppene med et medlem av en annen.

[0033] Native mAb-er som beskrives heri, kan tillages fra deres hybridomer. Genmodifiserte mAb-er, f.eks. kimære eller humaniserte mAb-er, kan uttrykkes ved hjelp av en mangfoldighet av fremgangsmåter som er kjent innenfor teknikken. Eksempelvis kan gener som koder for deres lett- og tungkjede-V-regioner syntetiseres fra overlappende oligonukleotider og settes inn sammen med tilgjengelige C-regioner til ekspresjonsvektorer (f.eks. kommersielt tilgjengelige fra Invitrogen) som tilveiebringer de nødvendige regulatoriske regioner, f.eks. promotorer, enhancere, poly A-steder osv. Anvendelse av CMV promotor-enhanceren er foretrukket. Ekspresjonsvektorene kan transfekteres under anvendelse av ulike velkjente fremgangsmåter, slik som lipofeksjon eller elektroporering, til en mangfoldighet av pattedyrscellelinjer, slik som CHO eller ikke-produserende myelomer, herunder Sp2/0 og NS0, og celler som uttrykker antistoffene som er selektert ved formlstjenlig antibiotisk seleksjon. Se f.eks. US-patent nr. 5,530,101. Større mengder antistoff kan produseres ved å dyrke cellene i kommersielt tilgjengelige bioreaktorer.

[0034] Når de er uttrykt, kan mAb-ene eller andre heri beskrevne antistoffer renses i henhold til standardprosedyrer innenfor teknikken, slik som mikrofiltrering, ultrafiltrering, A-

eller G-proteinaffinitetskromatografi, eksklusjonskromatografi, anionbytterkromatografi, kationbytterkromatografi og/eller andre former for affinitetskromatografi basert på organiske fargestoffer eller lignende. I det vesentlige rene antistoffer på i det minste 90 eller 95% w/w homogenitet foretrekkes, og 98% eller 99% w/w eller mer homogenitet er mest foretrukket, til farmasøytiske anvendelser.

3. Behandlingsmetoder

[0035] Heri beskrives fremgangsmåter for behandling hvori det heri beskrevne mAb (dvs. et anti-FGFR2 MAb) administreres til pasienter som har en sykdom (terapeutisk behandling) eller er i fare for forekomst eller rekurrens av en sykdom (profylaktisk behandling). Uttrykket "pasient" innbefatter humane pasienter; veterinære pasienter, slik som katter, hunder og hester; husdyr, slik som kyr, får og gris; og forsøksdyr som anvendes til forsøksformål, slik som mus og rotter. Fremgangsmåtene er særlig tilgjengelige for behandling av humane pasienter. mAb-ene som anvendes i fremgangsmåter for behandling av humane pasienter, binder til det humane FGFR2-protein, hvis sekvens er tilveiebrakt av GenBank Locus AF487553. Henvisninger til andre FGFR-er eller FGF-er som det vises til i denne beskrivelse, er tilveiebrakt i avsnittet om bakgrunnen for oppfinnelsen. Et mAb til et humant protein kan også anvendes i andre arter hvor artens homolog har antigen kryssreaktivitet med det humane protein. Hos arter som mangler kryssreaktivitet, anvendes et antistoff med passende spesifisitet for artens homolog som er til stede i den aktuelle art. I xenograft-forsøk på forsøksdyr anvendes imidlertid generelt et mAb med spesifisitet for det humane protein som uttrykkes ved hjelp av xenograften.

[0036] I et foretrukket eksempel tilveiebringer den foreliggende beskrivelse en farmasøytisk formulering som omfatter de heri beskrevne antistoffer. Farmasøytiske formuleringer inneholder mAb-et i en fysiologisk akseptabel bærer, valgfritt med eksipienser eller stabiliseringsmidler, i form av lyofiliserte eller vandige løsninger. Akseptable bærere, eksipienser eller stabiliseringsmidler er nontoksiske for resipienter ved de benyttede doseringer og konsentrasjoner, og innbefatter buffermidler såsom fosfat,

sitrat eller acetat ved en pH på typisk 5,0 til 8,0, oftest på 6,0 til 7,0; salter såsom natriumklorid, kaliumklorid osv. for å gjøre isotonisk; antioksidanter, preserveringsmidler, polypeptider med lav molekylvekt, proteiner, hydrofile polymerer såsom polysorbat 80, aminosyrer såsom glysin, karbohydrater, chelatdannere, sukkere og andre standard ingredienser som er kjente for fagmannen (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). mAb-er et typisk til stede ved en konsentrasjon på 0,1 - 100 mg/ml, f.eks. 1 - 10 mg/ml eller 10 - 50 mg/ml, for eksempel 5, 10, 20, 30, 40, 50 eller 60 mg/ml.

[0037] Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for behandling av en pasient med en sykdom under anvendelse av et anti-FGFR2-mAb i en farmasøytisk formulering. mAb-et som tillages i en farmasøytisk formulering, kan administreres til en pasient via en hvilken som helst passende vei, især parenteralt ved intravenøs infusjon eller bolusinjeksjon, intramuskulært eller subkutant. Intravenøs infusjon kan gis over så lite som 15 minutter, men oftere i 30 minutter eller over 1, 2 eller til og med 3 timer. mAb-et kan også injiseres direkte inn i sykdomsstedet (f.eks. en tumor), eller innkapsles i bæreremidler såsom liposomer. Dosen som gis, er tilstrekkelig til i det minste delvis å lindre tilstander som behandles ("terapeutisk effektiv dose") og er eventuelt 0,1 til 5 mg/kg kroppsvekt, for eksempel 1, 2, 3 eller 4 mg/kg, men kan være så høy som 0,1 eller 1 til 10 mg/kg eller til og med 1 til en hvilken som helst av 15, 20 eller 30 mg/kg. En fast enhetsdose kan også gis, for eksempel 100, 200, 500, 1000 eller 2000 mg, eller dosen kan være basert på pasientens overflateområde, f.eks. 1000 mg/m². Vanligvis administreres mellom 1 og 8 doser (f.eks. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8) til å behandle kreft, men 10, 20 eller flere doser kan gis. mAb-et kan administreres daglig, to ganger ukentlig, ukentlig, annenhver uke, månedlig eller ved et annet intervall, avhengig av mAb-ets halveringstid, i 1 uke, 2 uker, 4 uker, 8 uker, 3-6 måneder eller lenger. Gjentatte behandlingsløp er også mulig, som i kronisk administrasjon.

[0038] En kombinasjon av en dose, administrasjonsfrekvens og administrasjonsvei som er effektiv til i det minste delvis å lindre en sykdom som er til stede i en pasient under behandling, vises til som et terapeutisk effektivt regime. En kombinasjon av en dose, en

administrasjonsfrekvens og en administrasjonsvei som er effektiv til å inhibere eller forsinke sykdomsinntreden hos en pasient, vises til som et profylaktisk effektivt regime.

[0039] Sykdommer som særlig er mottakelige for behandling med de heri beskrevne anti-FGFR2-mAb-er innbefatter solide tumorer som antas å kreve angiogenese eller å være assosiert med detekterbar eller fortrinnsvis forhøyede nivåer av FGFR2 og/eller et FGF, for eksempel eggstokkreft, endometrialkreft, brystkreft, lungekreft (småcellet eller ikke-småcellet) kolorektal kreft, prostatakreft, livmorhalskreft, pankreaskreft, magekreft, spiserørskreft, hetapocellulært karsinom (leverkreft), renalt cellekarsinom (nyrekreft), hode- og nakketumorer, mesoteliom, melanom, sarkomer og hjernesvulster (f.eks. gliomer slik som glioblastomer). Forhøyede nivåer kan måles på protein- eller mRNA-nivå i kreftvev i forhold til sammenlignbare nivåer av FGFR2 (f.eks. FGFR2IIIb) eller FGF (f.eks. FGF2, FGF7 eller FGF10) i forhold til sammenlignbare nivåer av det respektive FGFR2 eller FGF i normalt vev, slik som vev-matchet ikke-kankrøst vev, fortrinnsvis fra den samme pasient. Detekterbare nivåer kan likeledes måles på protein- eller mRNA-nivået i kreftvev og sammenlignes med bakgrunnsnivåer i sammenligningsprøver hvori analytten (f.eks. FGFR2 eller FGF) er kjent for å være fraværende, eller i forhold til negative kontroller hvori deteksjon utføres under anvendelse av et antistoff eller en primer eller en probe som er kjent for ikke å binde analytten eller nukleinsyren som koder for analytten. Leukemier, lymfomer, multiple myelomer og andre hematologiske ondartetheter, især en hvilken som helst av disse krefttypene som har forøket ekspresjon av FGFR2 og/eller FGF, kan også være mottakelig for behandling med anti-FGFR2-mAb-ene. Andre sykdommer assosiert med angiogenese for hvilke behandling med de heri beskrevne anti-FGFR2-mAb-er er egnet, innbefatter aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), diabetisk retinopati, neovaskulært glaukom og andre øyensykdommer; psoriasis og andre hudlidelser; revmatoid artritt; og genetiske skjelettlidelser assosiert med mutasjoner i FGFR2-en, f.eks. Apert syndrom, som beskrevet ovenfor.

[0040] I en foretrukket utførelsesform administreres anti-FGFR2-mAb-et i kombinasjon med (dvs. sammen med, det vil si før, under eller etter) annen behandling. Eksempelvis for å behandle kreft kan anti-FGFR2-mAb-et administreres sammen med ett eller flere av de kjente kjemoterapeutiske legemidler, for eksempel alkyliserende stoffer, slik som karmustin,

klorambucil, cisplatin, karboplatin, oksaliplatin, prokarbazin og syklofosfamid; antimetabolitter slik som fluorouracil, floksuridin, fludarabin, gemcitabin, metotreksat og hydroksyurea; naturprodukter, herunder plantealkaloider og antibiotikum slik som bleomycin, doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, etoposid, mitomycin, mitoxantron, vinblastin, vinkristin og Taxol (paklitaxel) eller relaterte forbindelser, slik som Taxotere®; topoisomerase 1-inhibitoren irinotecan; midler spesielt godkjent for hjernesvulster, herunder temozolomid og Gliadel® weferholdig karmustin; og inhibitorer av tyrosinkinaser slik som Gleevec®, Sutent® (sunitinibmalat), Nexavar® (sorafenib) og Tarceva® (erlotinib) eller Iressa® (gefitinib); inhibitorer av angiogenese; og alle godkjente og eksperimentelle midler mot kreft anført i WO 2005/017107 A2. anti-FGFR2-mAb-et kan anvendes i kombinasjon med 1, 2, 3 eller flere av disse andre midler anvendt i et standard kjemoterapeutisk regime. Normalt er de andre midler de som allerede er kjente for å være effektive for den bestemte krefttype som behandles. anti-FGFR2-mAb-et er især nyttig i å overvinne motstand mot kjemoterapeutiske legemidler og derved øke deres effektivitet.

[0041] Andre midler som anti-FGFR2-mAb-et kan administreres sammen med for å behandle kreft, innbefatter bioteknologiske produkter slik som monoklonale antistoffer, herunder Herceptin™ mot HER2-antigenet; Avastin® mot VEGF; eller antistoffer til epidermisk vekstfaktor (EGF)-reseptoren, slik som Erbitux® (cetuximab) og Vectibix® (panitumumab). Antistoffer mot hepatocyt vekstfaktor (HGF) er særlig foretrukne for anvendelse med anti-FGFR2-mAb-et, herunder mAb L2G7 (Kim et al., Clin Cancer Res 12:1292, 2006 og US-patent nr. 7,220,410) og især dets kimære og humaniserte former, slik som HuL2G7 (WO 07115049 A2); de humane anti-HGF-mAb-er som beskrives i WO 2005/017107 A2, især 2.12.1; og de HGF-bindende proteiner som beskrives i WO 07143090 A2 eller WO 07143098 A2; og øvrige nøytraliserende anti-HGF-mAb-er som konkurrerer om binding med et hvilket som helst av de førnevnte mAb-er. Et mAb som binder HGF's cMet-reseptor foretrekkes også, for eksempel anti-cMet mAb-et OA-5D5 (Martens et al., Clin. Cancer Res. 12:6144, 2006) som har blitt genmodifisert til å ha kun én "arm", dvs. bindingsdomene. Antistoffer mot de øvrige FGFR-reseptorer FGFR1, 3, 4 eller mot ulike FGF-er slik som FGF1, FGF2 og FGF7 foretrekkes også til anvendelse i kombinasjon med anti-FGFR2-mAb-et. Videre kan anti-FGFR2-mAb-et anvendes sammen med en hvilken som helst form for kirurgi og/eller stråleterapi, herunder ekstern

strålebehandling, intensitetsmodulert strålebehandling (IMRT) og en hvilken som helst form for radiokirurgi, slik som f.eks. gammakniv.

[0042] Behandling (f.eks. standard kjemoterapi), herunder anti-FGFR2-mAb-antistoffet, kan lindre en sykdom ved å øke den mediane progresjonsfri overlevelsestid eller den generelle overlevelsestid for pasienter med kreft med i det minste 30% eller 40%, men fortrinnsvis med 50%, 60% til 70% eller til og med 100% eller lenger, sammenlignet med den samme behandling (f.eks. kjemoterapi), men uten anti-FGFR2-mAb-et. I tillegg eller alternativt kan behandling (f.eks. standard kjemoterapi) som innbefatter anti-FGFR2-mAb-et øke den komplette responsrate, den delvise responsrate eller den objektive responsrate (komplett + delvis) hos pasienter med disse tumorer (f.eks. ovarialtumor, magetumor, endometriumtumor, pankreastumor, brysttumor, lungetumor, kolontumor og glioblastomer, især ved tilbakefall eller refraktært) med i det minste 30% eller 40%, men fortrinnsvis med 50%, 60% til 70% eller til og med 100% sammenlignet med den samme behandling (f.eks. kjemoterapi), men uten anti-FGFR2-mAb-et.

[0043] I en klinisk utprøving (f.eks. en fase II-, fase II/III- eller fase III-utprøving) er de ovennevnte økninger i median progresjonsfri overlevelse og/eller responsrate for pasienter behandlet med kjemoterapi pluss anti-FGFR2-mAb-et i forhold til kontrollgruppen av pasienter som mottar kjemoterapi alene (eller pluss placebo), statistisk signifikant, for eksempel ved $p = 0,05$ eller $0,01$ eller til og med $0,001$ -nivå. De komplette og delvise responsrater bestemmes ved hjelp av objektive kriterier som alminneligvis anvendes i kliniske utprøvinger for kreft, f.eks. som oppført eller akseptert av National Cancer Institute og/eller Food and Drug Administration.

4. Andre metoder

[0044] De heri beskrevne anti-FGFR2-mAb-er finner også anvendelse i diagnostiske metoder, prognostiske metoder og laboratoriemetoder. De kan anvendes til å måle nivået av FGFR2 i en svulst eller i sirkulasjonen til en pasient med en tumor, og derfor til å følge og lede behandling av tumoren. Eksempelvis er en tumor som er assosiert med høye

nivåer av FGFR2 (f.eks. økt i forhold til vevsmatchet ikke-kankrøs prøve fra den samme pasient), spesielt mottakelig for behandling med et anti-FGFR2-mAb. I bestemte eksempler kan mAb-ene anvendes i et ELISA-assay eller i et radioimmunassay for å måle nivået av FGFR2, f.eks. i serum, eller i immunhistokjemi til å lokalisere FGFR2-ekspresjon, f.eks. i en tumorbiopsiprøve. Anvendelsen av to anti-FGFR2-mAb-er som binder til forskjellige epitoper (dvs. som ikke konkurrerer om binding), er især nyttige i utvikling av en sensitiv "sandwich"-ELISA for å detektere FGFR2. Til ulike assayer kan mAb-et merkes med fluorescerende molekyler, spinnmerkede molekyler, enzymer eller radioisotyper, og kan tilveiebringes i form av et kitt med alle nødvendige reagenser for å utføre assayet for FGFR2. I andre anvendelser anvendes anti-FGFR2-mAb-ene til å rense FGFR2, f.eks. ved affinitetskromatografi.

EKSEMPLER

Eksempel 1: Reagenser og assayer

[0045] Tillaging av Flag-FGF1, FLAG-FGF2 og FLAG-FGF7. DNA-sekvensen for humant FGF1 (formen med 155 aminosyrer; Chiu et al., *Oncogene* 5:755-1990) og humant FGF2 (formen med 155 aminosyrer; Sommer et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 144:543, 1987) ble syntetisert (GenScript, Inc), deretter PCR-amplifisert til å ha en N-terminal flag-peptid-tag og klonet i et derivat av pET-vektoren (Invitrogen) under anvendelse av standard molekylærbiologiteknikker. Disse plasmider ble transformert til *E.coli* BL21 (DE3)-celler og FGF1- eller FGF2-ekspresjon ble indusert under anvendelse av 1mM IPTG. Nivået av FGF-ekspresjon ble bestemt under anvendelse av et FGF1- eller FGF2-spesifikt ELISA-kit (R&D Systems). FGF ble renset under anvendelse av heparin-Sepharose CL-6B-perler (Amersham Biosciences) som beskrevet (Wiedlocha et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16:270, 1996). Likeledes ble et gen for humant FGF7 (prekursorformen med 194 aminosyrer; Finch, P.W. et al., *Science* 245:752, 1989) syntetisert og PCR-amplifisert til å ha et N-terminalt flag-tag i en pCMV-vektor (et derivat av pDrive, Invitrogen), og Flag-FGF10 ble tillaget på en analog måte. Plasmid-DNA-er ble transfektert til humane 293F-

celler. Dyrkningssupernatant av de transfekterte 293F-celler ble anvendt til ligand-reseptor-bindingsassayet.

[0046] Fremstilling av FGFR2-fusjonsproteiner. Det ekstracellulære domene (ECD) av humant FGFR2IIIb og humant FGFR2IIlc ble uttrykt som immunoadhesinmolekyler. For alfa-formene ble DNA-fragmentene som koder for hele ECD-et av FGFR2IIIb (aminosyre 1-378) eller FGFR2IIlc (aminosyre 1-377), fusjonert med humant Fc (rest 216 til 446) via en polypeptidlinker; for betaformene (manglende D1) ble aminosyre 152-378 for FGFR2(beta)IIIb og aminosyre 152-377 for FGFR2(beta)IIlc anvendt i stedet. Disse FGFR2-Fc-molekyler ble uttrykt ved å transfektere 293F-celler og selektare stabile transfektanter i nærvær av G418 (1 mg/ml) i 293 ekspresjonsmedium (Invitrogen). FGFR2-Fc-et utskilt fra 293F-transfektete celler, ble rensset under anvendelse av en protein-A/G-søyle. Likeledes ble cDNA fra krabbemakaken (cyno) FGFR2 ECD klonet ved hjelp av standardteknikker fra cyno-lever mRNA, og aminosyrer 1-378 ble fusjonert til humant Fc for å skape cyno-FGFR2IIIb-Fc med henblikk på ekspresjon. Sjimpanse-FGFR2IIIb-Fc ble konstruert under anvendelse av in vitro-mutagenese for å omdanne den ene aminosyre i det humane FGFR2IIIb ECD som er forskjellig fra sjimpanse-FGFR2IIIb, til sjimpanse-aminosyre (rest 186 metionin til treonin, basert på de kjente sekvenser i GenBank). Muse-FGFR2(beta)IIIb-Fc-protein ble anskaffet fra R&D Systems (katalognr. 708-MF).

[0047] ELISA-assay for mAb-binding til FGFR2-fusjonsprotein. ELISA-plater ble belagt med geit-anti-humant IgG-Fc (2 µg/ml) over natten ved 4°C. Deretter ble ikke-spesifikke bindingssteder blokkert med 2% BSA i 1 hr ved RT. Plater ble inkubert med ett av de ovenfor beskrevne FGFR2-fusjonsproteiner (1 µg/ml) i 1 hr, etterfulgt av inkubasjon med ulike konsentrasjoner av mAb-er eller hybridom-dyrkningsfluider i 1 hr. Det bundne mAb ble detektert med HRP-geit anti-mus-antistoff etterfulgt av vasking, tilsetning av TMB-substrat (Sigma) og avlesning ved 450 nm. I alle ELISA-assay ble plater vasket 3 ganger mellom hvert trinn.

[0048] Væskestrømscytometri. Etter vasking to ganger i celledyrkningsbuffer (CSB: PBS /1% FBS/0,02% NaN₃) ble 2 x 10⁵ celler resuspendert i 50 µl CSB i en mikrotiterbrønn og inkubert med 50 µl av det anti-FGFR2 mAb som skulle testes (1 µg/50

µl) i 1 hr på is. Celler ble deretter vasket to ganger i CSB og de bundne antistoffer detektert ved inkubasjon med FITC-geit-anti-mus-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) i 1 hr på is. Etter vasking to ganger i CSB ble celler analysert på et FACScan (Becton Dickinson).

Eksempel 2: Generering av monoklonale antistoffer til FGFR2

[0049] Balb/c-mus (5-6 uker gamle hunner) ble immunisert ved injeksjon i deres bakre hefteskiver ved intervaller på 1 uke enten 20 eller 22 ganger med FGFR2(beta)IIIb-Fc (initialdose 10 µg/hefteskive, deretter 5 µg/hefteskive), eller med 17 doser FGFR2IIIC-Fc (initialdose 10 µg/hefteskive, deretter 5 doser ved 2 µg, deretter ved 5 µg) etterfulgt av 5 doser FGFR2(beta)IIIC-Fc (ved 5 µg/hefteskive), med antigenet suspendert i MPL/TDM (Sigma-Aldrich). Tre dager etter den siste injeksjon ble popliteale lymfoidceller ekstrahert og fusjonert med P3/X63-Ag8U1 musemyelomceller i et forhold på 1:1 under anvendelse av et Hybrimmune Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences). Hybridomer ble selektert ved tilsetning av 2x HAT (Sigma) 24 hr senere. Ti dager etter fusjonen ble hybridomdyrknings supernatanter screenet for deres evne til å binde til FGFR2IIIb-Fc, men ikke til humant IgG, under anvendelse av ELISA. Selekterte mAb-er ble deretter screenet for deres evne til å gjenkjenne FGFR2IIIb på den humane gastrisk tumor-cellelinje SNU-16 (Shin et al, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 126:519, 2000). Selekterte hybridomer ble deretter klonet to ganger under anvendelse av begrensede fortynning-teknikken. Tre mAb-er som ble selektert på denne måte, var GAL-FR21 og GAL-FR22 fra det første immuniseringsregime, og GAL-FR23 fra det andre immuniseringsregime. Disse mAb-ers egenskaper er vist i fig. 2 som ytterligere beskrevet nedenfor.

[0050] I tillegg ble et antall øvrige anti-FGFR2-mAb-er oppnådd fra fusjonene, herunder 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, og FR2bB 18.1.6.

Eksempel 3: Egenskaper for anti-FGFR2-mAb-ene

[0051] Som vist i fig. 3 binder alle tre selekterte mAb-er GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 godt til FGFR2IIIb i det i eksempel 1 beskrevne ELISA-assay. Under anvendelse av fire forskjellige former for FGFR2-Fc i ELISA-et ble det fastslått at hvert av disse mAb-er har et annerledes bindingsmønster og derfor epitop (fig. 4). GAL-FR21 binder til både alfa- og betaformene av FGFR2IIIb (dvs. med og uten D1), men ikke til FGFRIIlc. Epitopen kan derfor ikke involvere D1 og må involvere D3IIIb, og omslutes derfor sannsynligvis av D3IIIb eller D3. GAL-FR22 binder også til både alfa- og betaformer, men i både IIIb- og IIlc-konteksten, så epitopen omslutes formodentlig av D2-D3IIla eller med sikkerhet D2-D3. Endelig binder GAL-FR23 ikke til en hvilken som helst av betaformene, slik at denne epitop må være helt eller delvis i D1. Derfor er mAb-er som har en epitop enten i D1 eller D2-D3 eller D3, omfattet av den foreliggende oppfinnelse.

[0052] For å bekrefte at mAb-ene GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 binder til forskjellige epitoper, ble det utført et konkurranseforsøk hvor hvert mAb ble biotinyllert, og deretter ble 0,4 µg av det biotinyllerte mAb konkurrert med et overskudd på 100:1 av hver av de øvrige umerkede mAb-er (eller kontroll-murinae mAb 5G8) for binding til FGFR2IIIb-Fc i det ovenfor beskrevne ELISA-assay (men med HRP-streptavidin som deteksjonsreagensen). Som vist i fig. 5 konkurrerte hvert mAb med seg selv om binding, men ikke med de øvrige mAb-er, noe som viser at de har forskjellige epitoper. I tillegg konkurrerte de øvrige mAb-er FR2bB 100.12.9, FR2bC 54.8.11, FR2bC 100.7.9, FR2bC 101.8.2, FR2bC 115.1.5, FR2bC 149.8.8 for binding med biotinyllert GAL-FR21 i dette assay, så derfor har de den samme eller overlappende epitop som GAL-FR21, mens mAb-ene FR2bB 11.5.3, og FR2bB 18.1.6 konkurrerte om binding med biotinyllert GAL-FR22, så har derfor den samme eller overlappende epitop som GAL-FR22.

[0053] For å bekrefte at de selekterte mAb-er binder til de passende former av FGFR2 på cellemembranen, ble væskestrømscytometri benyttet. KATO-III- (ATCC HTB-103) og SNU-16- (ATCC CRL-5974) celler, som overuttrykker FGFR2IIIb, ble anvendt til å teste binding til denne formen av reseptoren. Som vist i fig. 6 binder alle tre mAb-er GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 begge cellelinjer, som forventet fra deres ovenfor beskrevne epitoper. Humane 293F-celler transfektert med et gen for FGFRIIlc, ble anvendt til å teste

binding til denne formen etter verifisering av at ingen av mAb-ene binder til selve vert-293F-cellene. Som vist i fig. 7 binder GAL-FR22 og GALFR23, men ikke GALFR21 til de FGFR2IIIb-transfekterte celler, som forventet fra deres epitoper. Endelig, siden S252W-mutasjonen av FGFR2 finnes i noen kreftceller, ble binding av mAb-ene til 293F-celler transfektert med et FGFR2IIIb-gen konstruert til å inneholde denne mutasjonen (FGFR2IIIb(S252W)), testet. Som det også fremgår av fig. 7, bandt alle mAb-ene til de FGFR2IIIb(S252W)-transfekterte celler. Evnen til å binde FGFR2IIIb(S252W) er en foretrukket egenskap for mAb-er ifølge oppfinnelsen.

[0054] For å bestemme mAb-enes evne til å inhibere binding av FGF-ligander til FGFR2, ble et ELISA-assay anvendt. ELISA-brønner ble belagt med 2 µg/ml geit-anti-humant IgG-Fc over natten ved 4°C. Etter blokkering med 2% BSA i 1 hr ved RT ble brønnene inkubert med 0,5 µg/ml FGFR2IIIb-Fc i 1 hr, etterfulgt av inkubasjon med Flag-FGF1 eller Flag-FGF2 (0,2 µg/ml) i nærvær av ulike konsentrasjoner av mAb-er i 1 hr. Det bundne Flag-FGF ble detektert ved tilsetningen av HRP-anti-Flag M2-antistoff (Sigma) og deretter tilsetning av TMB-substrat. Som det fremgår av fig. 8A, blokkerte mAb-et GAL-FR21 svakt binding av FGF1 til FGFR2IIIb i dette assay, men GAL-FR22 og GAL-FR23 blokkerte ikke FGF1-binding. I kontrast til dette blokkerte GAL-FR21 kraftig binding av FGF2 til FGFR2IIIb, GAL-FR22 blokkerte FGF2-binding moderat, og GAL-FR23 blokkerte ikke binding. I lignende assayer, men under anvendelse av Flag-FGF7 og Flag-FGF10, ble det også vist (fig. 8B) at GAL-FR21 og GAL-FR22 blokkerer binding av FGF7 og FGF10 til FGFR2IIIb. mAb-er som GAL-FR21 og GAL-FR22, blokkerer faktisk med fordel binding av FGF2, FGF7 og FGF10 til FGFR2IIIb, fortrinnsvis med 80% eller 90% eller 95% eller fullstendig eller i det vesentlige fullstendig. Følgelig har det blitt vist at GAL-FR21 og GAL-FR22, men ikke GAL-FR23, nøytraliserer i det minste én biologisk aktivitet av FGFR2.

Eksempel 4: Xenograftmodeller

[0055] Xenograftforsøk utføres som tidligere beskrevet (Kim et al., Nature 362:841,1993). Humane tumorceller typisk dyrket i komplett DMEM-medium, høstes i HBSS. Atymiske, nakne hunnmus eller NIH-III Xid/Beige/nud mus (4-6 uker gamle) injiseres subkutan med

2-10 x 10⁶ celler i 0,1 ml HBSS i dorsalområdene. Når tumorstørrelsen når 50-100 mm³, grupperes musene tilfeldig, og 5 mg/kg (100 µg totalt) eller en annen dosering av mAb-er administreres i.p. to ganger i uken i et volum på 0,1 ml. Tumorstørrelser bestemmes to ganger ukentlig ved måling i to dimensjoner [lengde (a) og bredde (b)]. Tumorvolum beregnes i henhold til $V = ab^2/2$ og uttrykkes som midlere tumorvolum ± SEM. Antall mus i hver behandlingsgruppe er typisk 5-7 mus. Statistisk analyse kan utføres, f.eks. under anvendelse av Students t test.

[0056] Figur 9 og 10A viste at i ulike forsøk inhiberte alle av GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23 administrert ved et dosenivå på 20 µg (1 mg/kg) to ganger i uken, sterkt veksten av SNU-16 gastrisk tumor-xenograft, med GAL-FR21 værende det mest potente idet det fullstendig inhiberte vekst av xenograften. Det ovenfor nevnte mAb FR2bC 54.8.11 som konkurrerer om binding med GAL-FR21, inhiberte også xenograftvekst. Fig. 10B viser at GAL-FR21 og GAL-FR22 administrert ved et dosenivå på 50 µg (2,5 mg/kg) to ganger i uken, også sterkt inhiberte vekst av xenograftene til den OCUM-2M-humane gastriske tumorcellelinje (som er beskrevet i Yashiro et al., Jpn J Cancer Res 85:883, 1994). Disse mAb-enes evne til å inhibere xenograft av KATO III eller andre FGFR2-uttrykkende cellelinjer, vises likeledes. mAb-enes evne til å inhibere tumorvekst additivt eller synergistisk med andre tumorinhiberende midler som beskrevet ovenfor, påvises ved å behandle grupper av xenograftede mus med mAb-et alene, det annet middel alene, og mAb-et sammen med det annet middel, og idet det bemerkes at behandling med begge midler hadde en større inhibitorisk virkning enn et hvilket som helst av midlene alene.

Eksempel 5: Binding av mAb-er til FGFR2 fra andre arter

[0057] For å bestemme mAb-enes evne til å binde til FGFR2 fra andre arter enn humane, ble ELISA-assayer anvendt. ELISA-brønner ble belagt med 2 µg/ml geit-anti-humant IgG-Fc over natten ved 4°C. Etter blokkering med 2% BSA i 1 hr ved RT ble brønnene inkubert med 0,2 µg/ml FGFR2IIIb-Fc i 1 hr, hvor FGFR2IIIb i fusjonsproteinet enten var human-, mus-, krabbamakak- eller sjimpanse-FGFR2IIIb. Brønnene ble deretter inkubert med ulike konsentrasjoner av GAL-FR21 eller GAL-FR22 mAb. De bundne mAb-er ble detektert ved

tilsetning av HRP-konjugert geit-anti-mus-IgG-Fc og deretter TMB-substrat. Fig. 11 viser at GAL-FR21 binder til mus-FGFR2 nesten like godt (innenfor 10 ganger) som humant FGFR2, mens GAL-FR22 binder til mus-FGFR2 noenlunde godt (innenfor cirka 100 ganger av humant FGFR2). Fig. 12 viser at GAL-FR21 binder til krabbemakak-FGFR2 like godt som (ikke skjelnbart fra) humant FGFR2, mens GAL-FR22 binder til krabbemakak-FGFR2 noenlunde godt (innenfor cirka 100 ganger av humant FGFR2). Et lignende forsøk med sjimpanse-FGFR2 ga de samme resultater som med krabbamakak-FGFR2: GAL-FR21 bandt til sjimpanse-FGFR2 like godt som (ikke skjelnbart fra) humant FGFR2, mens GAL-FR22 bandt noenlunde godt til sjimpanse-FGFR2 (innenfor cirka 100 ganger av humant FGFR2). Foretrukne mAb-er, slik som GAL-FR21 og GAL-FR22, binder til alle av mus-, ape-, sjimpanse- og human-FGFR2, og mest foretrukket binder mus-FGFR2 innenfor 2, 10, 100 eller 1000 ganger så godt som humant FGFR2, og/eller binder ape- og/eller sjimpanse-FGFR2 innenfor 2, 10 eller 100 ganger eller ikke skjelnbart fra (forsøksvariasjon) humant FGFR2 (som målt f.eks. ved K_a). Binding til andre arters FGFR2 gjør testing av mAb-ene i disse dyrearter enklere å utføre.

Eksempel 6: Humanisering av GAL-FR21 og GAL-FR22

[0058] Kloning av de variable lettkjede- og tungkjede-regioner av GAL-FR21-mAb-et, konstruksjon og ekspresjon av et kimært mAb, og design, konstruksjon, ekspresjon og rensning av et humanisert GAL-FR21 mAb, ble alle utført under anvendelse av standardmetoder innenfor molekylærbiologi, f.eks. som beskrevet i US 20080019974 for L2G7-mAb-et. Aminosyresekvensene til de (modne) variable (V) lettkjede- og tungkjede-regioner av GAL-FR21 er vist i henholdsvis fig. 13A og 13B, øverste linjer merket GAL-FR21. For å designe et humanisert GAL-FR21 mAb ble nærmere bestemt fremgangsmåtene til Queen et al., US-patent nr. 5,530,101 og 5,585,089 generelt fulgt. Den humane V_K -sekvens CAG27369 og V_H -sekvens AAB00780, som vist i henholdsvis fig. 13A og 13B, nederste linjer, ble respektivt valgt til å tjene som akseptorsekvenser for GAL-FR21 VL- og VH-sekvensene, fordi de har særlig høy rammeverkhomologi (dvs. sekvensidentitet) med dem. En datamaskingenerert molekylmodell av det variable GAL-FR21-domenet ble anvendt til å lokalisere de aminosyrer i GAL-FR21-rammeverket som er

tilstrekkelig nærme CDR-ene til potensielt å interagere med dem. For å designe de humaniserte variable GAL-FR21 lettkjede- og tungkjede-regioner ble CDR-ene fra musens GAL-FR21 mAb først konseptuelt podet inn i akseptorrammeverksregionene. Ved rammeverksposisjoner hvor datamaskinmodellen antydte signifikant kontakt med CDR-ene, hvilket kan være nødvendig for å opprettholde CDR-konformasjonen, ble aminosyrene fra museantistoffet substituert for det humane nettverks aminosyrer. For det humaniserte GAL-FR21 mAb betegnet HuGAL-FR21, ble dette gjort ved rest 27, 28, 30 (i Chothia hypervariabel sløyfe H1) og 48 og 67 av tungkjeden og ikke ved noen rester i lettkjeden, under anvendelse av Kabat-nummerering. Lettkjede- og tungkjede-V-region-sekvensene av HuGAL-FR21 er vist i henholdsvis fig. 13A og 13B, midtre linjer merket HuGAL-FR21, hvor de er justert mot den respektive GAL-FR21-donor og human akseptor V-regioner – CDR-ene (som definert av Kabat) er understreket, og de ovenfor anførte substituerte aminosyrer er dobbelt understreket.

[0059] Beskrivelsen tilveiebringer ikke kun et humanisert GAL-FR21 mAb, HuGAL-FR21, herunder de i fig. 13 viste lett- og tungkjede-V-regioner, men også variant humaniserte mAb-er hvis variable lett- og tungkjede-regioner er forskjellige fra HuGAL-FR21-sekvensene med et lite antall (f.eks. typisk ikke mer enn 1, 2, 3, 5 eller 10) utskiftninger, delesjoner eller insersjoner, vanligvis i rammeverket, men muligvis i CDR-ene. Nærmere bestemt kan kun en delmengde av de ovenfor beskrevne substitusjoner foretas i akseptorrammeverkene, eller ytterligere substitusjon(er) kan foretas, f.eks. kan mus-GAL-FR21 VH-aminosyren 69L erstatte akseptor-aminosyren 69I, og/eller mus-aminosyrene kan erstatte de respektive aminosyrer i den humaniserte lettkjede ved en hvilken som helst av de Kabat-nummererte posisjoner 1, 3 og 60 og 63, som har noen proksimitet med CDR-ene. Faktisk kan mange av rammeverksrestene som ikke er i kontakt med CDR-ene i det humaniserte mAb, legge til rette for substitusjoner av aminosyrer fra de tilsvarende posisjoner av donormusens mAb eller øvrige muse- eller humanantistoffer, og selv mange potensielle CDR-kontaktresten er også mottakelige for substitusjon eller til og med aminosyrer hvori CDR-ene kan endres. Ett eksempel på en CDR-substitusjon er å substituere en rest i en CDR med resten som inntar den tilsvarende posisjon av den humane akseptorsekvens som anvendes til å supplere variabel region-rammeverk.

[0060] Som oftest er utskiftingene som foretas i variant humaniserte GAL-FR21-sekvenser, konservative hva angår de utskiftede HuGAL-FR21-aminosyrer. Aminosyrer kan grupperes som følger for å bestemme konservative substitusjoner, dvs. substitusjoner i en gruppe: Gruppe I (hydrofobiske sidekjeder); met, ala, val, leu, ile; gruppe II (nøytrale hydrofile sidekjeder): cys, ser, thr; gruppe III (sure sidekjeder): asp, glu; gruppe IV (basiske sidekjeder): asn, gln, his, lys, arg; gruppe V (rester som innvirker på kjedeorientering): gly, pro; og gruppe VI (aromatiske sidekjeder): trp, tyr, phe.

[0061] Det foretrekkes at utskiftinger i HuGAL-FR21 (uansett om de er konservative eller ikke) ikke har noen vesentlig effekt på det humaniserte mAb's bindingsaffinitet eller -potens, det vil si dets evne til å nøytralisere FGFR2's biologiske aktiviteter (f.eks. er potensen i noen eller alle av de heri beskrevne assayer av det variant humaniserte GAL-FR21 mAb i det vesentlige den samme, dvs. innenfor forsøksfeil, som den av HuGAL-FR21). Det foretrekkes at de moden variant lett- og tungkjede-V-regionsekvenser er i det minste 90%, mer foretrukket i det minste 95%, og mest foretrukket i det minste 98% identiske med de respektive HuGAL-FR21 modne lett- og tungkjede V-regioner. Alternativt er andre humane variable regioner av antistoff med høy sekvensidentitet med de av GAL-FR21, også egnet til å tilveiebringe det humaniserte antistofframmeverk, især kappa V-regioner av de humane undergruppe I- og tungkjede V-regioner fra human undergruppe I, eller konsensussekvenser av disse undergrupper.

[0062] I andre humaniserte antistoffer er i det minste 1, 2, 3, 4 eller alle 5 av posisjonene av de i forbindelse med eksemplet på antistoff (dvs., H27, H28, H30, H48, H67) nevnte akseptor til donor-substitusjoner fortrinnsvis inntatt av den rest som inntar den tilsvarende posisjon av mus-donor antistoff-tungkjeden. Dersom tungkjedens akseptorsekvens er en annen enn AAB00780, kan en akseptor til donorsubstitusjoner være eller eventuelt ikke være påkrevet for den bestemte okkupans av et bestemt variabelt rammeverksregionposisjon, avhengig av hvorvidt resten som inntar den bestemte posisjon, allerede er den samme mellom akseptoren og donor.

[0063] Det heri drøftede eksempel på mAb HuGAL-FR21 har konstante humane κ - og γ 1-

regioner, f.eks. som presentert i US 2008019974, og er derfor en IgG1. De fullstendige sekvenser av de (modne) lett- og tungkjeder av HuGAL-FR21 er vist i fig. 14. Selv om disse sekvenser er av henholdsvis Km(3)- og G1 m(3)-allotypene, er det klart at IgG1 mAb-er av en hvilken som helst (IgG1, κ) allotype er omfattet av betegnelsen HuGAL-FR21. Det vil også være klart at når HuGAL-FR21 fremstilles ved hjelp av konvensjonelle prosedyrer, kan én til flere aminosyrer ved lett- og/eller tungkjedens amino- eller karboksyterminal, slik som tungkjedens C-terminal-lysin, være manglende eller derivatisert i en del av eller alle av molekylerne, og en slik sammensetning vil stadig være omfattet av betegnelsen HuGAL-FR21 og betraktes som et humanisert GAL-FR21-mAb. Humaniserte mAb-er av andre isotyper (f.eks. IgG2, IgG3 og IgG4) kan tillages ved å kombinere de variable HuGAL-FR21-regioner med de formålstjenlige konstante humane regioner. Utskiftninger kan foretas i de konstante HuGAL-FR21-regioner for å redusere eller øke effektorfunksjonen, slik som komplementmediert cytotoxisitet eller ADCC (se f.eks. Winter et al., US-patent nr. 5,624,821; Tso et al., US-patent nr. 5,834,597; og Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), eller for å forlenge halveringstiden i mennesker (se f.eks. Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Nærmere bestemt, men uten begrensning, er HuGAL-FR21 som har mutasjoner i den konstante IgG-region til en Gln ved posisjon 250 og/eller en Leu ved posisjon 428, ytterligere antistoffer som beskrives heri.

[0064] For å sammenligne HuGAL-FR21's bindingsaffinitet med den til muse-mAb-et GAL-FR21, ble et kompetitivt bindingsforsøk utført under anvendelse av standard ELISA-teknologi. Nærmere bestemt ble ELISA-brønner belagt med 2 $\mu\text{g/ml}$ geit-anti-human IgG-Fc over natten ved 4°C. Etter blokkering med 2% BSA i 1 hr ved RT, ble brønnene inkubert med 0,5 $\mu\text{g/ml}$ FGFR2IIIb-Fc. Brønnene ble deretter inkubert med biotinyllert GAL-FR21 mAb (0,05 $\mu\text{g/ml}$) i nærvær av økende konsentrasjoner av umerket GAL-FR21, HuGAL-FR21 eller kontroll-human-antistoff hIgG. Nivået av bundet biotinyllert GAL-FR21 ble bestemt ved tilsetning av HRP-streptavidin og substrat. Som vist i fig. 15 konkurrerte HuGAL-FR21 og GAL-FR21 omtrent like godt, med HuGAL-FR21 muligens litt bedre, noe som indikerer at bindingsaffiniteten for FGFR2 av HuGAL-FR21 er i det minste like høy som (mus) GAL-FR21 mAb. Fra konsentrasjonen av HuGAL-FR21 som er nødvendig for å inhibere binding av det merkede mAb med 50%, kan man estimere at bindingsaffiniteten

K_a av HuGAL-FR21 for FGFR2 er i det minste cirka 10^9 M^{-1} . HuGAL-FR21 kan også testes i et hvilket som helst av de biologiske assayer for FGFR2-aktivitet som beskrives heri, f.eks. inhibering av FGF2 eller FGF7 til FGFR2, og vil inhibere FGFR2-aktivitet komparabelt med GAL-FR21.

[0065] Et humanisert GAL-FR22 mAb kan designes, konstrueres, produseres og analyseres på den samme eller lignende måte som HuGAL-FR22. Aminosyresekvensene til de (modne) variable lettkjede- og tungkjede-regioner av GAL-FR22 er vist i henholdsvis fig. 16A og 16B, linjer merket GAL-FR22. Et humanisert GAL-FR22 mAb har en humanisert lettkjede som omfatter CDR-er fra sekvensen i fig. 16A, og en humanisert tungkjede som omfatter CDR-er fra sekvensen i fig. 16B. I noen tilfeller omfatter det humaniserte GAL-FR22 mAb de i fig. 16A viste tre lettkjede-CDR-er og de i fig. 16B viste tre tungkjede-CDR-er. Det foretrekkes at det humaniserte GAL-FR22 mAb har bindingsaffinitet for FGFR2 innenfor 2 eller 3 ganger affiniteten av mus-GAL-FR22 mAb, og har mest foretrukket bindingsaffinitet som ikke kan skjernes fra eller som er større enn affiniteten til GAL-FR22 mAb-et, som målt f.eks. ved hjelp av et konkurranse-ELISA, som beskrevet for HuGAL-FR21 og GAL-FR21.

[0066] Selv om gjenstanden heri har blitt beskrevet under henvisning til for nærværende foretrukne utførelsesformer, er det klart at tallrike modifikasjoner kan foretas. Med mindre annet fremgår av sammenhengen, kan et/en hvilket/hvilken som helst trinn, element, utførelsesform, trekk eller aspekt av beskrivelsen anvendes med et/en hvilken/hvilken som helst annen/annet. Dersom en nukleinsyre eller proteinsekvens som er assosiert med et aksesjonsnummer endres, menes den versjonen av sekvensen som er assosiert med dette aksesjonsnummeret per 7. november 2008.

[0067] Hybridomene som produserer de monoklonale antistoffer GAL-FR21, GAL-FR22 og GAL-FR23, har blitt deponert hos American Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, som henholdsvis ATCC-nummer PTA-9586 den 6. november 2008, PTA-9587 den 6. november 2008 og PTA-9408 den 12. august 2008, under Budapest-konvensjonen. Disse deponeringer vil opprettholdes i et autorisert depot og vil bli utskiftet i tilfelle av mutasjon, ikke-viabilitet eller destruksjon i en tidsperiode på i det minste fem år

etter at den nyligste forespørsel om frigivelse av en prøve er mottatt av depotet, i en periode på i det minste tretti år etter deponeringsdato, eller under det relaterte patents rettskraftige tid, uansett hvilken periode som er lengst. Alle begrensninger på disse cellelinjers tilgjengelighet for offentligheten vil bli ugjenkallelig fjernet ved utstedelse av et patent fra søknaden.

Patentkrav

1. Monoklonalt antistoff (mAb) som binder til fibroblastvekstfaktorreseptor 2 (FGFR2), hvor mAb-et omfatter tre lettkjede-CDR-er som har aminosyresekvensene henholdsvis KASQGVSNDA (CDR-L1), SASYRYT (CDR-L2) og QQHSTTPYT (CDR-L3); og tre tungkjede-CDR-er som har aminosyresekvensene henholdsvis TYNVH (CDR-H1), SIYPDNGDTSYNQNFKG (CDR-H2) og GDFAY (CDR-H3).
2. mAb ifølge krav 1, som er et Fab- eller F(ab')₂-fragment eller et enkeltkjedet antistoff.
3. mAb ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som er kimært.
4. mAb ifølge krav 1, som er humanisert.
5. mAb ifølge krav 1, som er humanisert, og hvor den variable lettkjede-region har i det minste 95% sekvensidentitet med den i SEQ ID NO:2 viste sekvens, og den variable tungkjede-region har i det minste 95% sekvensidentitet med den i SEQ ID NO:5 viste sekvens.
6. Humanisert antistoff ifølge krav 5, hvor rester H27, H28, H30, H48, og H67 etter Kabat-nummerering inntas av den rest som inntar den tilsvarende posisjon i den i SEQ ID NO:4 viste tungkjede.
7. mAb ifølge krav 1, som er humanisert, og hvor den variable lettkjede-region har den i SEQ ID NO:2 viste sekvens, og den variable tungkjede-region har den i SEQ ID NO:5 viste sekvens.
8. mAb ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som er av human IgG1-isotype.
9. Farmasøytisk sammensetning som omfatter et mAb som binder til fibroblastvekstfaktorreseptor 2 (FGFR2) og omfatter de tre lettkjede-CDR-er som har aminosyresekvensene henholdsvis KASQGVSNDA (CDR-L1), SASYRYT (CDR-L2) og QQHSTTPYT (CDR-L3); og tre tungkjede-CDR-er som har aminosyresekvensene

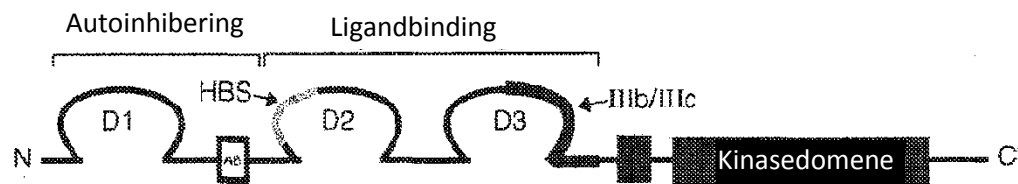
henholdsvis TYNVH (CDR-H1), SIYPDNGDTSYNQNFKG (CDR-H2) og GDFAY (CDR-H3).

10. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 9, hvor mAb-et omfatter en lettkjede som har den i SEQ ID NO:9 viste sekvens, og en tungkjede som har den i SEQ ID NO:10 viste sekvens, forutsatt at C-terminal-lysinet av SEQ ID NO:10 kan mangle.

11. mAb ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8 til anvendelse i behandling av kreft.

12. mAb til anvendelse ifølge krav 11, hvor nevnte kreft er magekreft.

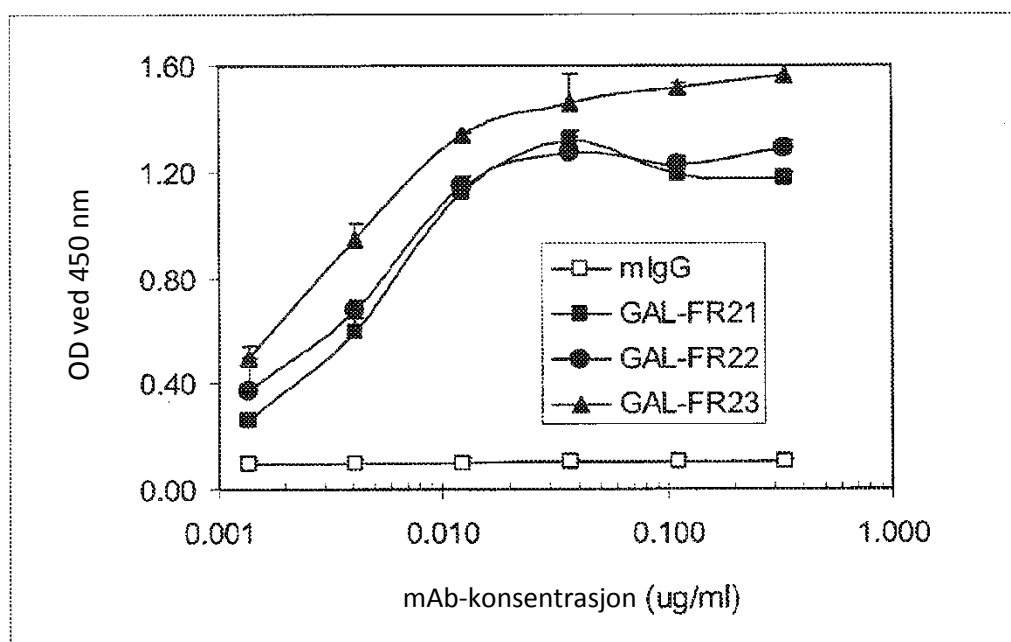
Tegning



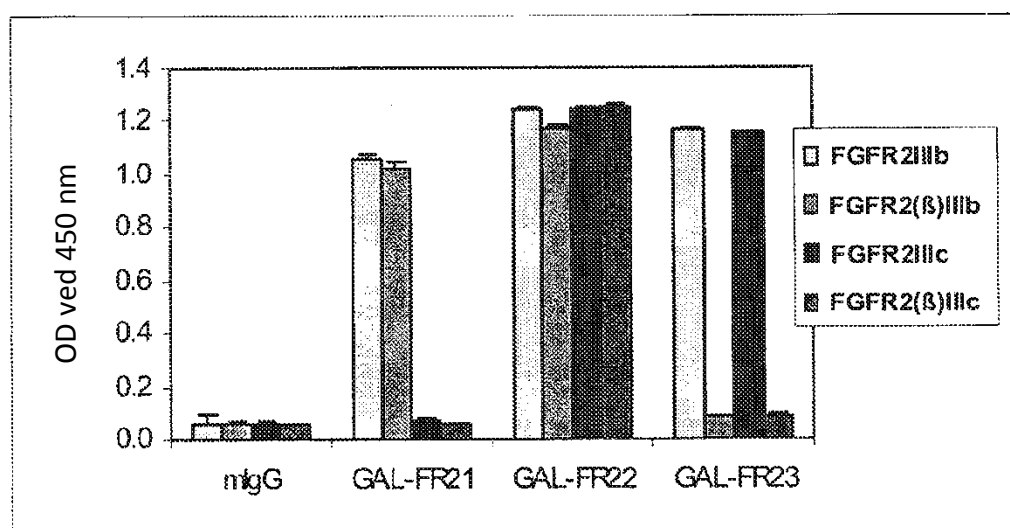
FIGUR 1

	Isotype	Epitop	Blokkerende ELISA		FACS			<i>In vivo</i>
			FGFR2IIIb-Fc binde til		SNU-16	293 transfektant		Anti-tumor
			Flag-FGF1	Flag-FGF2	Live	Fixed	S252W	SNU-16
GAL-FR21	IgG ₁	D3	+	+++	+++	+++	+++	++++
GAL-FR22	IgG _{2b}	D2-D3	-	++	+++	-	+++	+++
GAL-FR23	IgG _{2b}	D1	-	-	+++	+	+++	+++

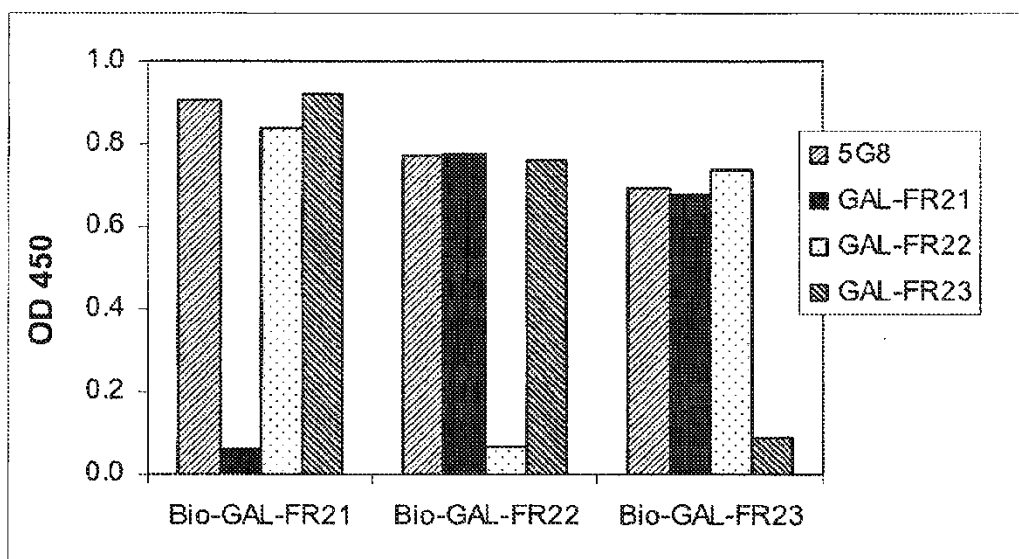
FIGUR 2



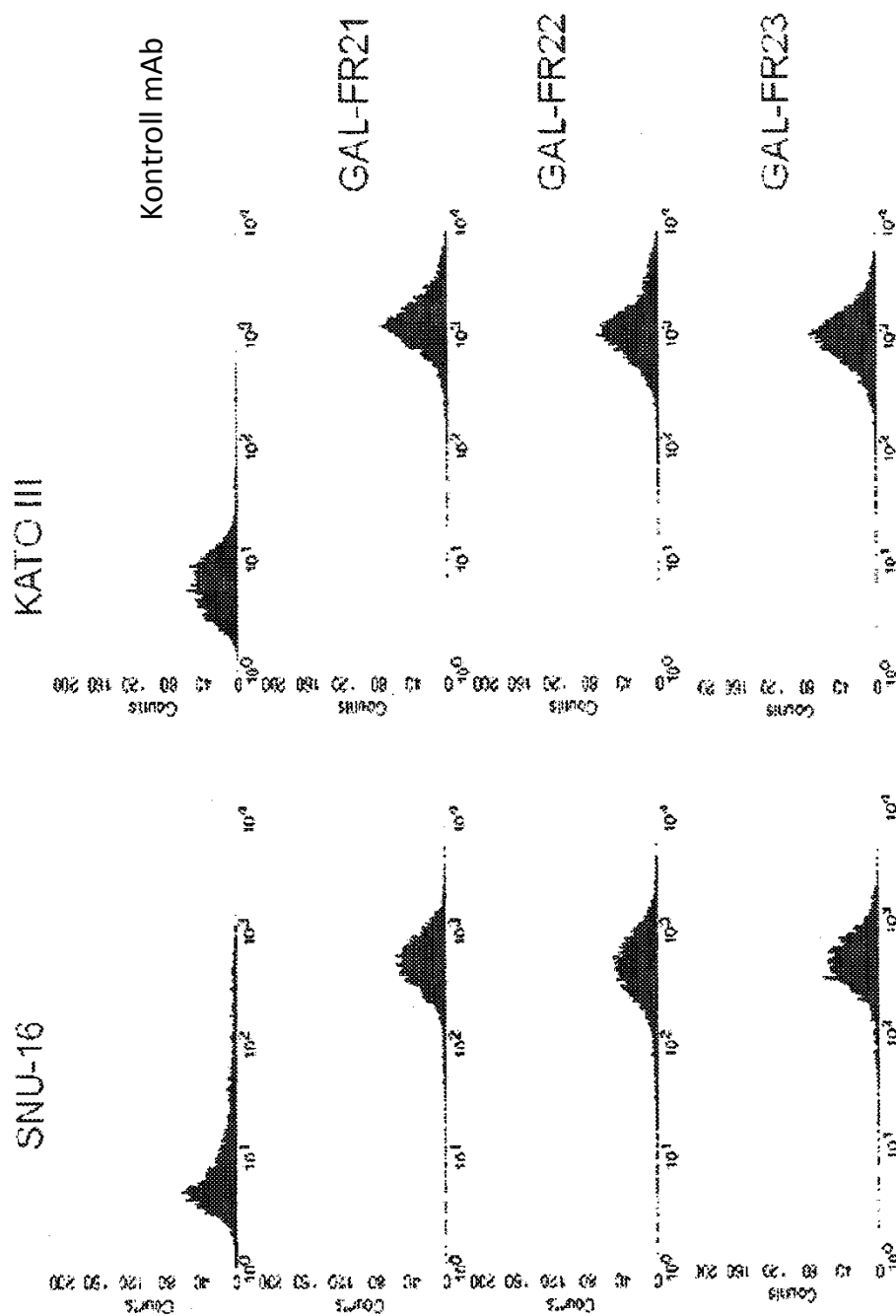
FIGUR 3



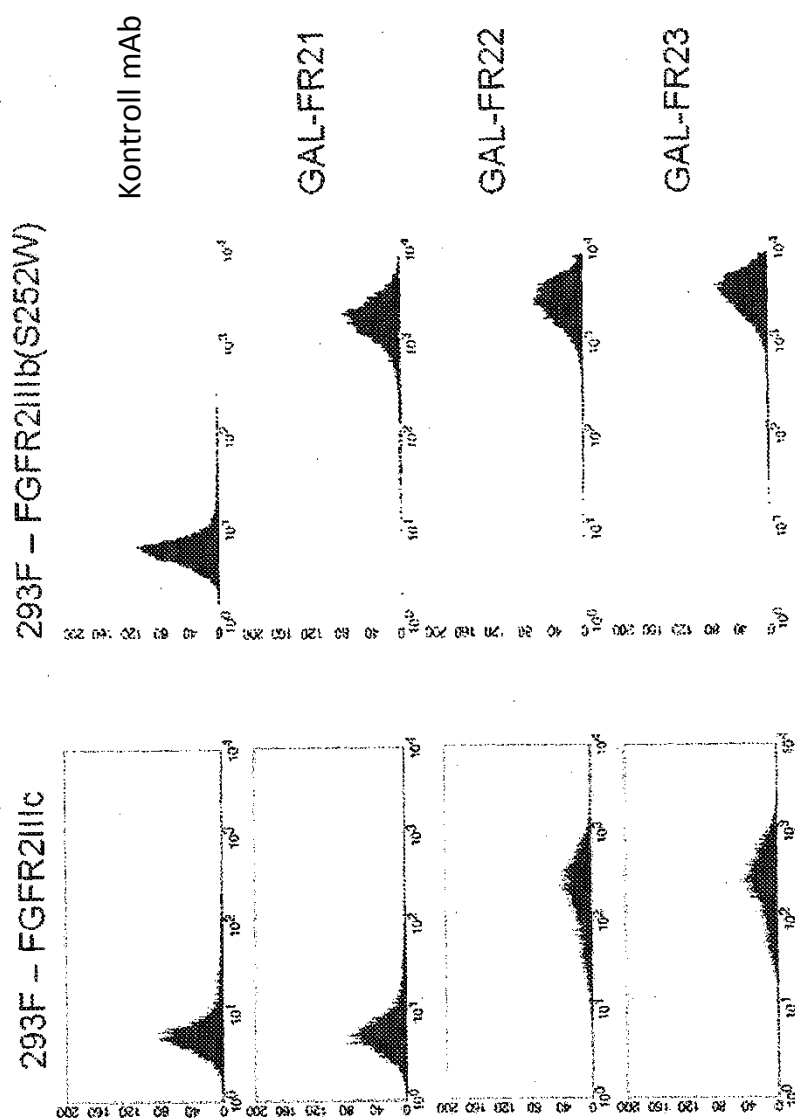
FIGUR 4



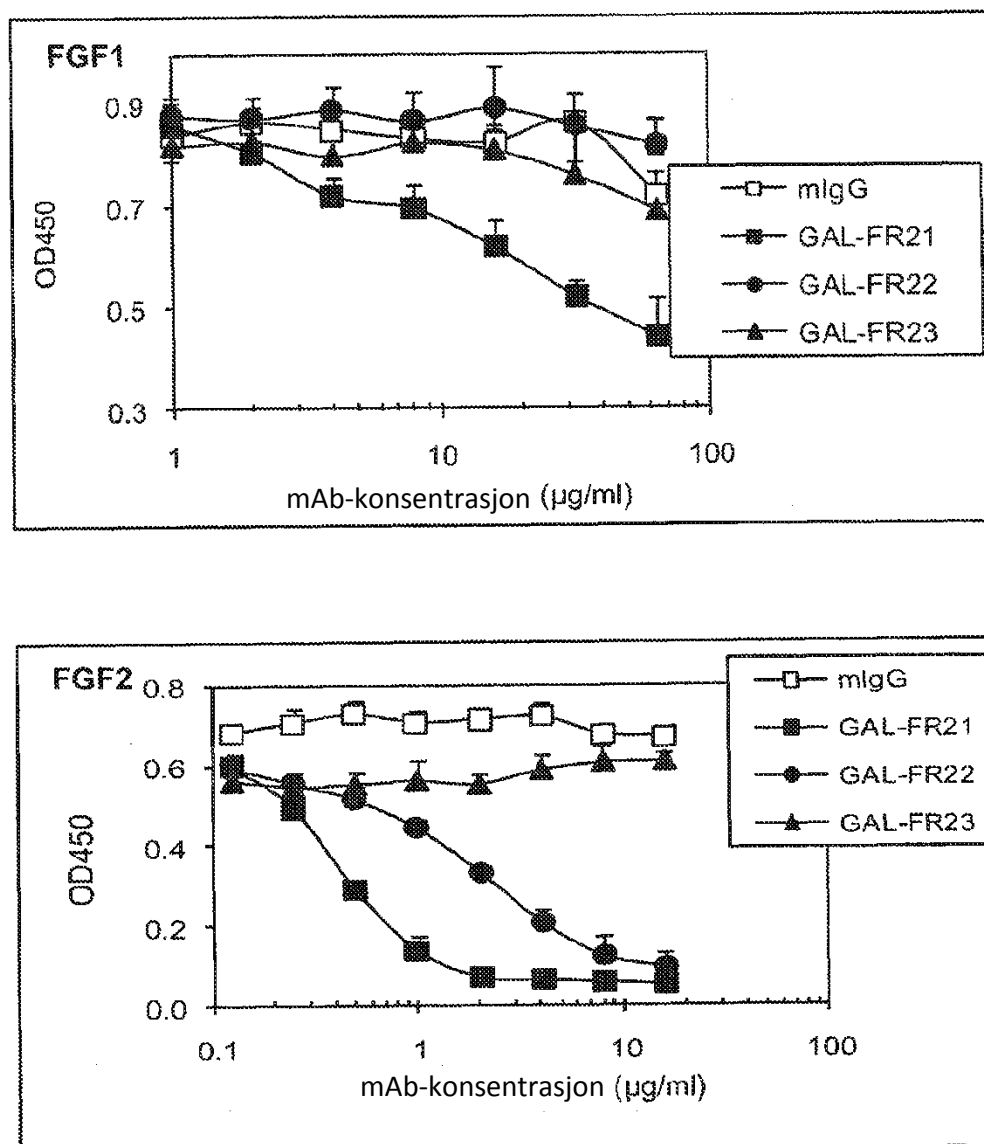
FIGUR 5



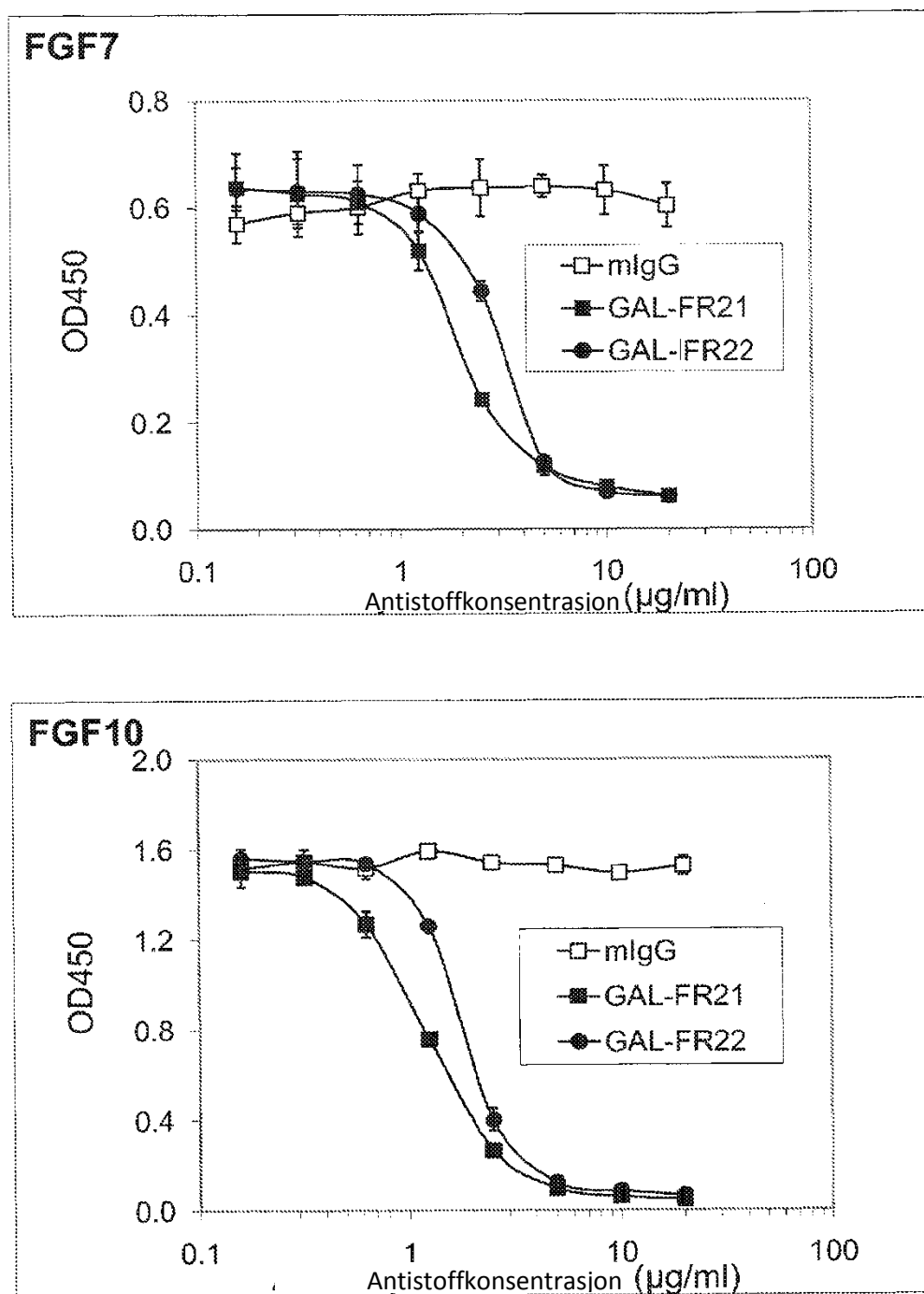
FIGUR 6



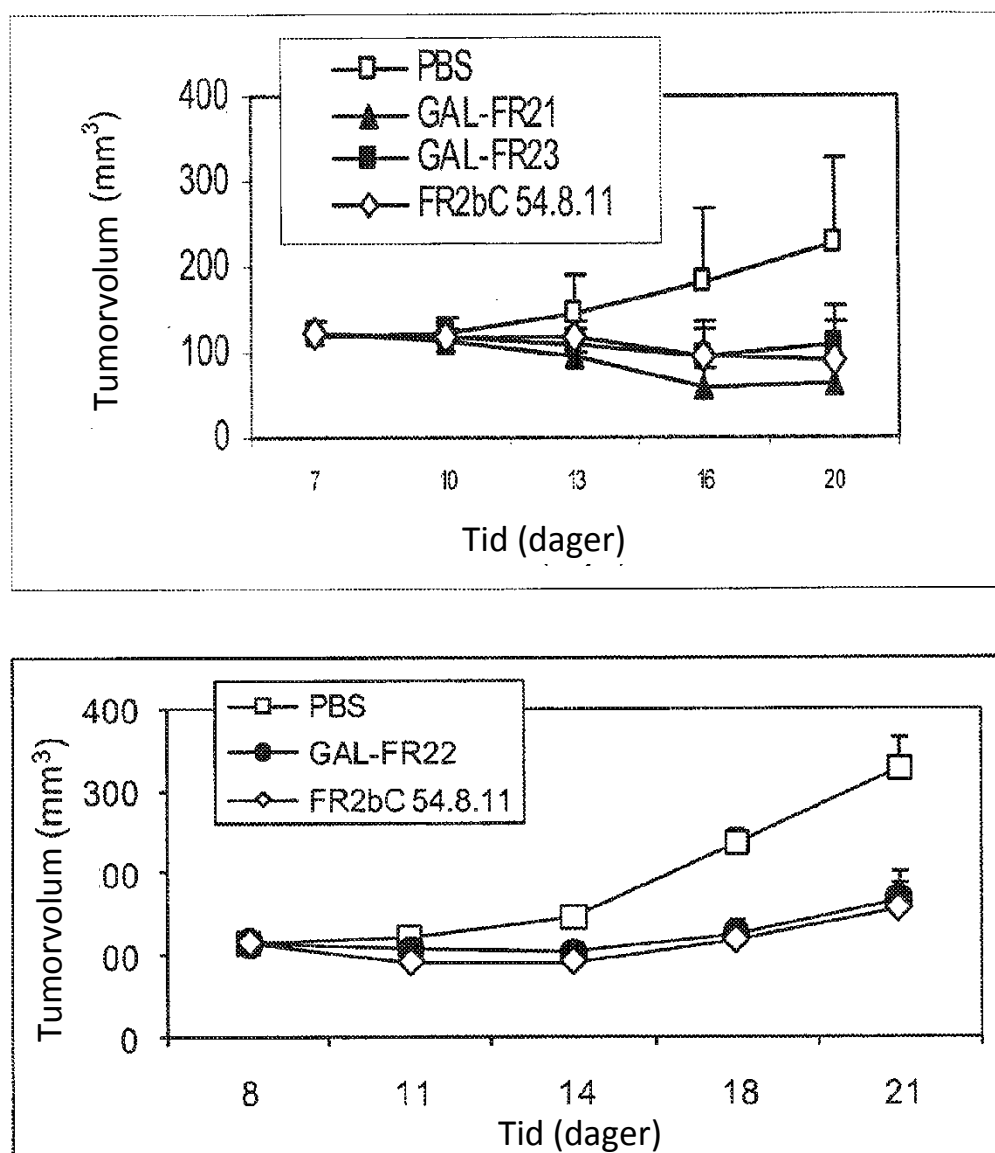
FIGUR 7



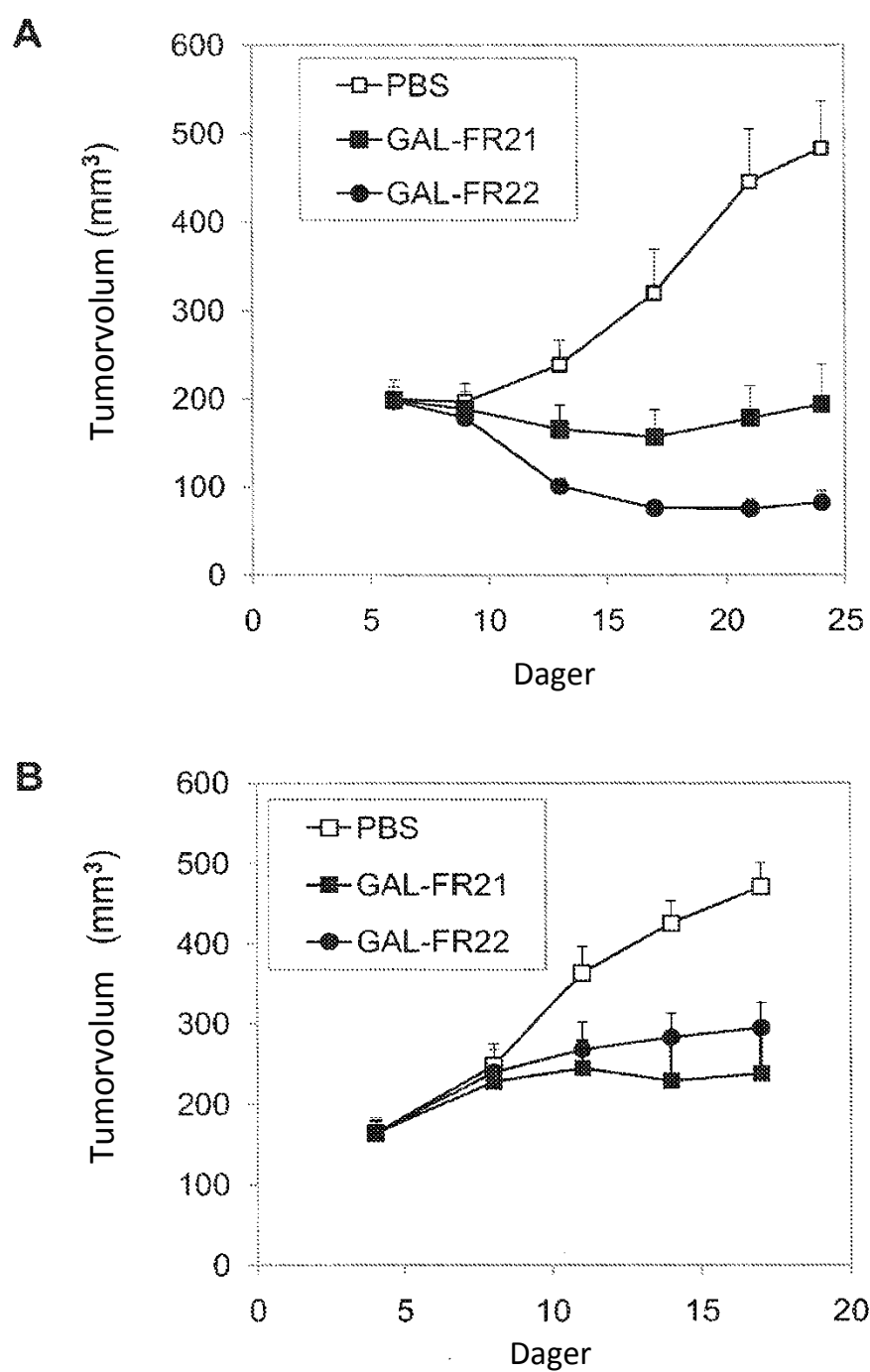
FIGUR 8A



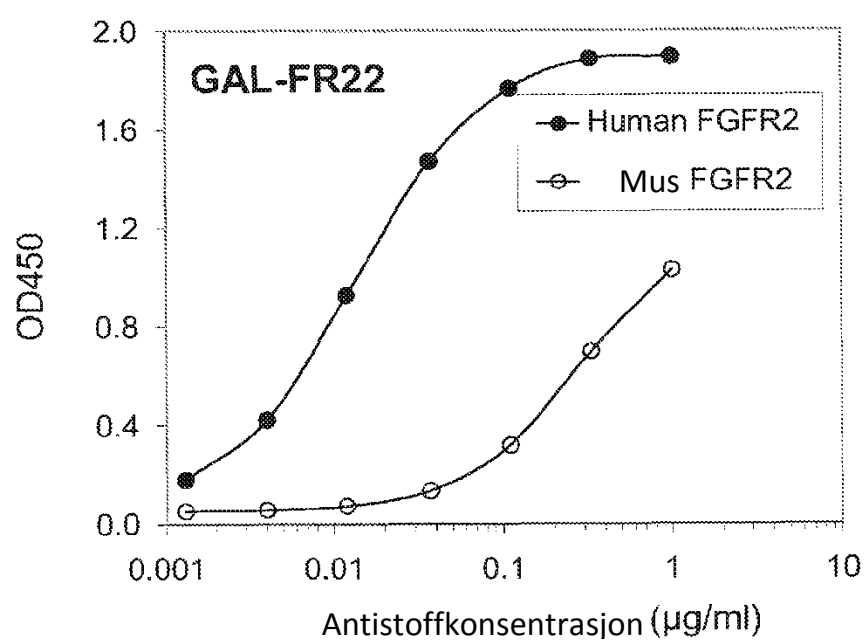
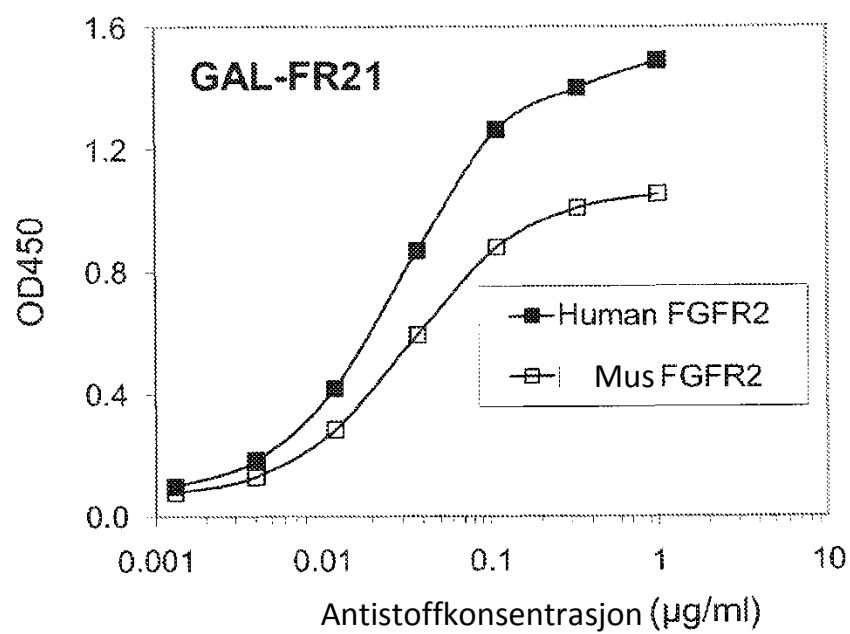
FIGUR 8B



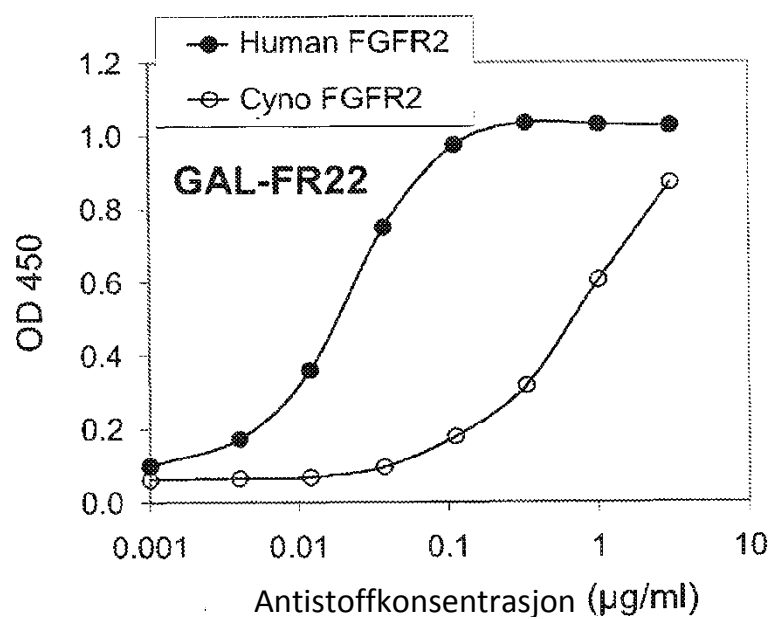
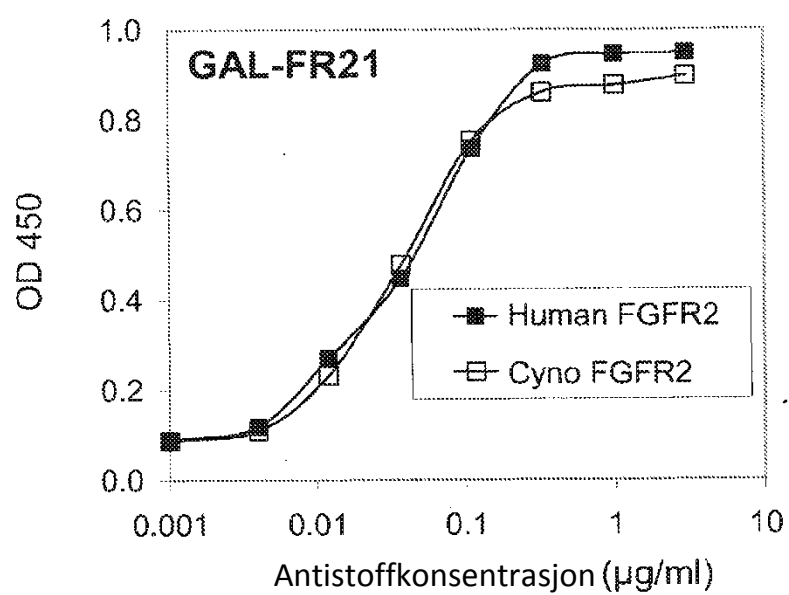
FIGUR 9



FIGUR 10



FIGUR 11



FIGUR 12

A

	1	2	3	4
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	NIVMTQSPKS	MSMSVGDRVS	<u>ITCKASQGVS</u>	<u>NDVAWYQKKP</u>
HuGAL-FR21	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	<u>ITCKASQGVS</u>	<u>NDVAWYQQKP</u>
CAG27369	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCqasqdis	nylnWYQQKP

	5	6	7	8
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	GQSPKLLIYS	<u>ASYRYTGVPD</u>	<u>RFTGSGSGTD</u>	<u>FTFTISNVQA</u>
HuGAL-FR21	GKAPKLLIYS	<u>ASYRYTGVPD</u>	<u>RFTGSGSGTD</u>	<u>FTFTISSLQP</u>
CAG27369	GKAPKLLIYd	asnletGVPS	RFTGSGSGTD	FTFTISSLQP

	9	10	
1234567890	1234567890	1234567	
GAL-FR21	<u>EDLAVYYCQQ</u>	<u>HSTTPYTFGG</u>	GTKLEIK
HuGAL-FR21	<u>EDIATYYCQQ</u>	<u>HSTTPYTFGQ</u>	GTKLEIK
CAG27369	EDIATYYCqq	ydnlpptFGQ	GTKLEIK

B

	1	2	3	4
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GAL-FR21	<u>QVQLQQPGAE</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	QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGGTFS	syaisWVRQA

	5	a	6	7	8
1234567890	12234567890	1234567890	1234567890	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	PGQGLEWMGg	iipifgtanya	qkfqqRVTIT	ADKSTSTAYM	

	abc	9	10	11
1222234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123
GAL-FR21	<u>QLSSLTSEDSAVY</u>	<u>YCARGDF</u>	<u>AYWGQGLVT</u>	VSV
HuGAL-FR21	<u>ELSSLRSED TAVY</u>	<u>YCARGDF</u>	<u>AYWGQGLVT</u>	VSS
AAB00780	ELSSLRSED TAVY	YCARgstvtgtgdf	dYWGQGLVT	VSS

FIGUR 13

A

```

1          DIQMTQSPSS
11  LSASVGD RVTITCKASQGVSN DVAWYQQKPK
41  GKAPKLLIYSASRYTGVPSRFSGSGSGTD
71  FTFTISSSLQPED IATYYCQQHSTTPTFGQ
101  GTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
131  SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
161  ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
191  VYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC

```

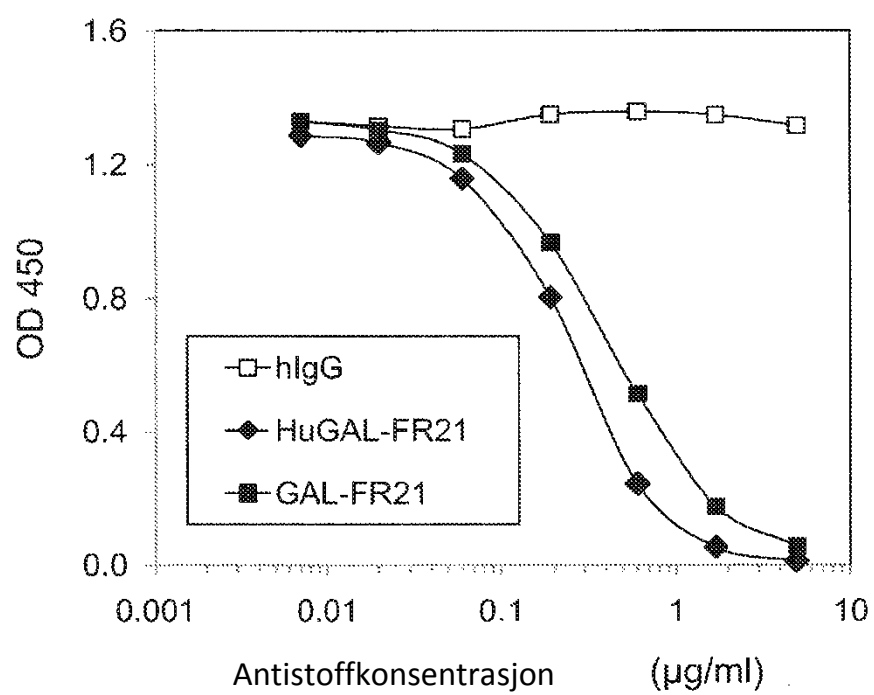
B

```

1          QVQLVQSGAEVK
13  KPGSSSVKVSCKASG YIFTTYNVHWVRQAPG
43  QGLEWIGSIYPDNGDTSYNQNEFKGRATITA
73  DKSTSTAYMELSSSLRSEDTAVYYCARGDFA
103  YWCGQCTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKST
133  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
163  GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
193  QTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKHT
223  CPPPCF APELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISR
253  TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
283  NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVQLHQLDNL
313  GKEYYKCCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG QPRE
343  PQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
373  DIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSDGSFF
403  LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNH
433  YTKKSLSLSPGK

```

FIGUR 14



FIGUR 15

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	YSFISISNLEP
	9	10		
	1234567890	1234567890	1234567	
GAL-FR22	EDIATYYCLQ	YDDL YM	FGG	GTKL DIK

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	PGKGLEWLGV	IWSGGSTDYN	ADFRSRLSIS	KDNSKSQIFF
	abc	9	10abcd	11
	1222234567890	123456789000000	1234567890	123
GAL-FR22	KMNSLPDDTAIY	YCANFYGYDDYVM	DYWGQGTSVT	VSS

FIGUR 16