(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102046803 B
(45)授权公告日 2014.09.17

(21)申请号 200980119682.5

(22)申请日 2009.05.28

(30)优先权数据
61/057,183 2008.05.29 US
61/170,561 2009.04.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.11.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/045519 2009.05.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/148928 EN 2009.12.10

(83)生物保藏信息
PTA 8864 2008.01.08

(73)专利权人 星系生物科技责任有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·J·金 L·王 H·帕克
M·瓦斯克兹

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.
C12P 21/08(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件
US 20060240437 ,2006.10.26,
US 20070036797 ,2007.02.15,
Jun A. Takahashi, et al..Inhibition of cell growth and tumorigenesis of human glioblastoma cells by a neutralizing antibody against human basic fibroblast growth factor.《FEBS》.1991,

审查员 杨振宇

权利要求书1页 说明书15页
序列表7页 附图9页

(54)发明名称

碱性成纤维细胞生长因子的单克隆抗体

(57)摘要

本发明涉及碱性成纤维细胞生长因子的中和性单克隆抗体、包含它们的药物组合物以及包括向患者施用此类药物组合物的治疗方法。

CN 102046803 B

1. 单克隆抗体，其结合并中和人碱性成纤维细胞生长因子 FGF2，包含：含有来自图 11A 中所示 GAL-F2 序列的 3 个 CDRs 的轻链，和含有来自图 11B 中所示 GAL-F2 序列的 3 个 CDRs 的重链。

2. 权利要求 1 的单克隆抗体，其是嵌合的。

3. 权利要求 1 的单克隆抗体，其是人源化的。

4. 权利要求 1 的单克隆抗体，其是 Fab 或 F(ab′)2 片段或单链抗体。

5. 人源化抗体，其包含人源化轻链和人源化重链，所述人源化轻链含有来自图 11A 中 GAL-F2 序列的 3 个 CDR，所述人源化重链含有来自图 11B 中 GAL-F2 序列的 3 个 CDR，其中 Kabat 编号的残基 H1、H27、H30、H48、H67、H71 和 H94 被占据图 11B 中所示 GAL-F2 重链的相应位置的残基占据。

6. 权利要求 5 的人源化抗体，其中轻链可变区与图 11A 中所示 HuGAL-F2 序列具有至少 95％序列同一性，且所述重链可变区与图 11B 中所示 HuGAL-F2 序列具有至少 95％序列同一性。

7. 权利要求 5 的人源化抗体，其含有图 11A 和图 11B 中所示 HuGAL-F2 的 3 个轻链 CDR 和 3 个重链 CDR。

8. 药物组合物，其包含权利要求 1-7 之任一项的抗体。

9. 权利要求 1-7 之任一项的抗体在制备治疗癌症的药物中的用途。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述癌症是肝细胞癌。

碱性成纤维细胞生长因子的单克隆抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据 35U.S.C. §119(e),本申请要求于 2008 年 5 月 29 日提交的美国专利申请号 61/057,183 和于 2009 年 4 月 17 日提交的美国专利申请号 61/170,561 的权益,所述专利申请以其整体并入本文用于所有目的。

[0003] 对以计算机可读格式提交的“序列表”、表格、或计算机程序列表的引用

[0004] 写入文件 022382-000820US_SEQLIST.TXT 中的序列表为 12,406 字节,创建于 2009 年 5 月 28 日,用于随同提交的 Kyung Jin Kim 等人″碱生成纤维细胞生长因子的单克隆抗体″的申请。该文件中所包含的信息特此并入作为参考。

[0005] 对于在联邦政府资助的研究或开发下取得的发明的权利申明

[0006] 本申请中所描述的工作部分地得到美国国立卫生研究院的 Grant5R44CA101283-03 资助。美国政府在本发明中拥有一定的权利。

发明领域

[0007] 本发明一般地涉及组合单克隆抗体 (mAb) 和重组 DNA 技术用于开发新的生物学,更具体地,例如涉及生产能够与碱性成纤维细胞生长因子结合并将其中和的单克隆抗体。

[0008] 发明背景

[0009] 原型成纤维细胞生长因子 (FGF)、酸性 FGF(也称为 FGF1) 和碱性 FG F(也称为 FGF2) 首次分离于 20 世纪 70 年代 (FGF2 由 Gospodarowicz 等人,J.Biol.Chem.250 :2515,1975 分离)。目前有 22 个已知的 FGF 家族成员,基于其活性和序列的相似性,可分成 7 个亚家族 (Ornitz 等人,Genome Biol.2 :3005.1,2001)。然而,FGF 家族成员仅与以组织特异性方式表达的 4 种酪氨酸激酶受体 (FGFR14) 及其同种型结合。FGF1 亚组由 FGF1 和 FGF2 组成,其结合所有 4 种 FGFR,其中 FGF2 与 FGFR1c 特别强地结合 (Ornitz 等人, J.Biol.Chem.271 :15292,1996)。

[0010] 成熟形式的人 FGF2 是 18kDa 非糖基化多肽,其由衍生自 155aa 前体的 146 个氨基酸组成 (Ornitz 等人, Genome Biol.2 :3005.1,2001 ;Okada-Ban 等人, Int.J.Biochem.Cell.Biol.32 :263,2000)。该 18kDa 形式的 FGF2 不编码信号序列,但是可以通过不依赖 ER-Golgi 复合物的非常规能量依赖性通道分泌 (Mignatti 等人,J.Cell Physiol.151 :81,1992 ;Florkiewicz 等人, J.Cell Physiol.162 :388,1995)。除该 18kDa 形式之外,单拷贝的 FGF2 基因还编码该蛋白质的 4 个高分子量 (HMW) 形式,通过利用 4 个可选 CUG 起始位点 (提供各种大小的 N- 末端延伸),产生 22kDa(196 个 aa)、22.5kDa(201 个 aa)、24kDa(210 个 aa) 和 34kDa(288 个 aa) 的蛋白质 (Florkiewicz 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 :3978,1989 ;Prats 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 :1836,1989)。HMW 形式不分泌,但被转运到细胞核,在细胞核中其可以以胞内分泌方式调节细胞生长或行为 (Dclrieu, FEBS Lett.468 :6,2000)。

[0011] 除了以高亲和性结合 FGFR1-4 之外,FGF2 还以较低的亲和性与硫酸肝素蛋白聚糖 (HSPG) 结合。尽管 FGF2 以单体形式分泌,但是细胞表面 HSPG 使 FGF2 以非共价的并排构

型二聚化，随后这种构型能够使FGF受体二聚化并活化 (Mohammadi 等人，Cytokine Growth Factor Rev16 :107，2005)。FGF 和 HSPG 与 FGFR 的胞外结构域的结合诱导受体二聚化、活化和自磷酸化。

[0012] FGF、特别是 FGF2 具有在各种细胞类型上的广谱活性 (Ornitz 等人，Genome Biol. 2 :3005. 1，2001)。FGF2 刺激包括成纤维细胞和内皮细胞在内的某些细胞增殖（即，促有丝分裂的），并且是某些细胞例如神经细胞的存活因子（抗细胞凋亡）(Okada-Ban，参见上文所引文献）。其还刺激内皮细胞的分化（形态发生）和迁移（运动性）(Dow 等人，Urology 55 :800，2000)。FGF2 参与发育，尤其是神经系统的发育。重要的是，FGF2 是强效的生血管因子 (Presta 等人，Cytokine and Growth Factor Rev. 16 :159，2005)。

[0013] 据认为，FGF2 和其它 FGF 通过刺激血管生成和直接地刺激肿瘤细胞，在癌症中起作用 (Presta 等人，参见上文所引文献）。在肿瘤进展期间，癌症细胞可以响应从基质细胞分泌（旁分泌）的胞外 FGF2，然后这些肿瘤细胞自身可以分泌 FGF2，并以自分泌方式响应 FGF2。已经显示 FGF2 或其受体 FGFR1 在大多数神经胶质瘤中被表达或过表达 (Takahashi 等 人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :5710，1990 ;Morrison 等 人 Cancer Res. 54 :2794，1994)。FGF2 参与前列腺瘤的进展 (Dow 等人，Urology 55 :800，2000)，并且是恶性黑素瘤增殖的关键介质 (Wang 等人，Nature Med. 3 :887，1997)。对于唾液腺瘤 (Myoken 等人，J. Path. 178 :429，1996)、食管癌 (Barclay 等人，Clin. Cancer Res. 11 :7683，2005) 和甲状腺癌 (Boelaert 等人，J. Clin. Endocrin. Metabol. 88 :2341，2003)，也已报导 FGF2 或 FGFR1 的过表达和 / 或其参与肿瘤进展。

[0014] 已报导，FGF2 的多克隆抗体（抗血清）可以抑制小鼠内可移植软骨肉瘤的肿瘤生长 (Baird 等人，J. Cell Biochem. 30 :79，1986)，体外中和 FGF2 的各种活性 (Kurokawa 等人，J. Biol. Chem. 264 :7686，1989)，以及当被局部应用时可以抑制 U87 神经胶质瘤细胞颅内异种移植物的生长 (Stan 等人，J. Neurosurg. 82 :1044，1995)。在单克隆抗体中，已报导 DG2mAb 可以在体外和在体内中和 FGF2 的活性 (Reilly 等人，Biochem. Biophys. Res. Com. 164 :736，1989 ;WO 91/06668)，适度抑制裸鼠中大鼠 C6 神经胶质瘤异种移植物的生长 (Gross 等人，J. Nat. Cancer Inst. 85 :121，1993)，以及当损伤内递送而非腹膜内或静脉内递送时适度抑制大鼠软骨肉瘤的生长 (Coppola 等人，Anticancer Res. 17 :2033，1997)。类似地，已报导抗 -FGF2mAb DE6 体外抑制神经胶质瘤细胞的生长 (Morrison 等人，J. NeuroscienceRes. 34 :502，1993)。在另一方面，报导抗 -FGF2mAb bFM-1 和 bFM-2 体外抑制内皮细胞的生长，但是不体内阻断肿瘤血管生成 (Matsuzaki 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :9911，1989)。已报导中和性抗 -FGF2mAb1E6 抑制 RPMI4788 结肠瘤异种移植物的生长 (Aonuma 等人，19 :4039，1999)。已报导抗 -FGF2mAb 254F1 抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 增殖，也已报导 mAb FB-8 体外抑制非小细胞肺癌细胞系增殖 (Kuhn 等人，LungCancer 44 :167，2004)。曾报导抗 -FGF2mAb 3H3 抑制 U87MG 和 T98G 神经胶质瘤以及 HeLa 细胞异种移植物的生长 (Takahashi 等人，FEBS Let. 288 :65，1991)，并且抑制小鼠内 K1000FGF2 转染的 3T3 细胞系的生长 (Hori 等人，Cancer Res. 51 :6180，1991)。

[0015] 本文所描述的 GAL-F2 抗 -FGF2mAb 在 AACR 2009 年会上于海报 #1236 中述及，其为了所有目的整体并入本文。

[0016] 发明简述

[0017] 在一个实施方案中，本发明提供了人碱性成纤维细胞生长因子 (FGF2) 的中和性 mAb。该 mAb 抑制 FGF2 的至少一种、优选几种或所有生物学活性，包括与 4 种 FGF 受体 FGFR1-4 中的一种或多种的结合；诱导成纤维细胞、内皮细胞、Mv 1Lu 貂肺上皮细胞和 / 或各种人肿瘤细胞的增殖；和诱导血管生成。该抗 -FGF2mAb 当被用作单一活性剂时可以抑制此类活性。优选的抗 -FGF2mAb 抑制小鼠中人肿瘤异种移植物的生长。优选地，本发明的 mAb 被遗传工程化，例如嵌合、人源化或人 mAb。示例性抗体是 GAL-F2 及其嵌合形式和人源化形式，以及与 GAL-F2 具有相同表位或与 GAL-F2 发生竞争结合的 mAb。还提供了产生此类抗体的细胞系。在另一个实施方案中，提供了含有中和性抗 -FGF2 抗体例如嵌合或人源化 GAL-F2 的药物组合物。在第三实施方案中，将药物组合物施用于患者以治疗癌症或其它疾病。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1. GAL-F2 与对照小鼠 mAb(mIgG) 和人 FGF2(hFGF2) 与小鼠 FGF29(mFGF2) 的结合 ELISA。

[0020] 图 2. FGFR-Fc/FGF2-Flag 结合 ELISA 显示，GAL-F2 而非对照小鼠 mAb 5G8 对 4 种 FGF 受体 FGFR1-4 中的每种具有抑制作用。

[0021] 图 3. 生物素化 GAL F2 与各种抗 -FGF2mAb 对人 FGF2 的竞争结合测定试验。

[0022] 图 4. GAL-F2 或对照 mAb 5G8 对 FGF2 诱导的 BaF3 细胞增殖的抑制，所述 BaF3 细胞用 FGFR1 或 FGFR2 稳定转染。“无 (None)”表示没有 FGF2(或 mAb) 施用于细胞上。

[0023] 图 5. GAL-F2 或对照 mAb 5G8 对 FGF2 诱导的 Mv 1Lu 貂肺上皮细胞增殖的抑制。“无 (None)”表示没有 FGF2(或 mAb) 施用于细胞上。

[0024] 图 6. 在对照小鼠 mAb(mIgG)、GAL-F2 或 bFM-1 抗 -FGF2mAb 的存在下克隆在软琼脂中的 SMCC-7721 细胞的显微照片。

[0025] 图 7. 从肿瘤接种后 5 天开始，用 GAL-F2(100μg，每周两次) 或 PBS 单独处理的小鼠中 RPMI 4788 人结肠瘤异种移植物的生长。

[0026] 图 8. 从肿瘤接种后 6 天开始，用 GAL-F2 或 bFM-1 抗 -FGF2mAb(100μg，每周两次) 或 PBS 单独处理的小鼠中 RPMI 4788 人结肠瘤异种移植物的生长。

[0027] 图 9. 用 PBS 单独、GAL-F2(100μg，每周两次)、顺铂 (100μg，每周一次) 或用 GAL-F2 和顺铂处理的小鼠中 SMMC-7721 人肝瘤异种移植物的生长。每组 5 只小鼠。

[0028] 图 10. 从接种后 6 天开始，用 PBS 单独、GAL-F2 或 M225 抗 -EGFRmAb(100μg，每周两次) 或用 GAL-F2 和 M225 处理的小鼠中 HepG2 人肝瘤异种移植物的生长。每组 6 只小鼠。

[0029] 图 11A 和 11B. 显示 HuGAL-F2 轻链 (A)(SEQ ID NO :2) 和重链 (B) 成熟可变区 (SEQ ID NO :5) 的氨基酸序列与小鼠 GAL-F2(SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :4) 及人受体 V 区 (SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :6) 进行比对。GAL-F2 序列中的 CDR 用下划线标出，HuGAL-F2 序列中用小鼠 L2G7 氨基酸置换的氨基酸用双下划线标出。对于轻链和重链，均使用 1 字母氨基酸代码和 Kabat 编号系统。

[0030] 图 12. 如本说明书所述进行的人源化 (HuGAL-F2) 和嵌合 (ChGAL-F2)mAb 与对照人抗体 hIgG 的竞争结合。

[0031] 图 13. 完整成熟 HuGAL-F2 抗体轻链 (A)(SEQ ID NO :7) 和重链 (B)(SEQ ID NO :

8) 的氨基酸序列。对每行上的第 1 个氨基酸编号 ;编号是连续的。在轻链中,Cκ 区域的第 1 个氨基酸用下划线标出,而在重链中,CH 1 区、铰链区、CH2 和 CH3 区的第 1 个氨基酸用下划线标出。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明提供了中和性抗 -FGF2 单克隆抗体、含有它们的药物组合物以及使用它们治疗疾病的方法。

[0034] 1. 抗体

[0035] 抗体是非常大的复杂分子 (分子量为～ 150,000 或约 1320 个氨基酸),具有复杂的内部结构。天然抗体分子含有相同的两对多肽链,每对具有一条轻链和一条重链。每个轻链和重链又由两个区域构成 :参与结合靶抗原的可变区 (″ V″),和与免疫系统的其它组分相互作用的恒定区 (″ C″)。轻链和重链可变区在 3 维空间中靠在一起,形成与抗原 (例如在细胞表面上的受体) 结合的可变区。在每个轻链或重链可变区内,有 3 个短片段 (长度平均为 10 个氨基酸),被称为互补决定区 (″ CDR″)。抗体可变结构域中的 6 个 CDR(3 个来自轻链,3 个来自重链) 在 3-D 空间中折叠在一起,形成了锁定在靶抗原上的实际抗体结合位点。CDR 的位置和长度已由 Kabat, E. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学重要的蛋白质的序列),U.S.Department of Health and Human Services,1983,1987 精确地确定。未包含在 CDR 中的可变区部分被称为构架,其形成了 CDR 的环境。Chothia 等人,J.Mol.Biol.196 :901,1987 已定义了由结构决定的超变区或环的相关概念。

[0036] 人源化抗体是遗传工程化抗体,其中来自小鼠抗体 (″ 供体抗体″,也可以是大鼠、仓鼠或其它非人物种) 的 CDR 被移植到人抗体 (″ 受体抗体″) 上。受体抗体的序列可以是例如,成熟人抗体序列、人抗体序列的共有序列或种系序列。因此,人源化抗体是具有来自供体抗体的 CDR 和来自人抗体的可变区构架和恒定区的抗体。此外,为了保留高的结合亲和性,可以使用两个额外的结构要素中的至少一个。参考美国专利号 5,530,101 和 5,585,089(并入本文作为参考),其提供了构建人源化抗体的详细说明。人源化抗体通常具有人源化重链和人源化轻链。通常,人源化重链的重链可变区构架和人源化轻链的轻链可变区构架不包括超过 10 或 12 个置换,所述置换产生不存在于受体人重链或轻链可变区构架 (包括人共有可变区构架和复合人可变区构架) 中的残基。

[0037] 尽管人源化抗体通常掺入小鼠抗体的所有 6 个完整 CDR(如 Kabat 所定义),但是它们也可用少于小鼠抗体的全部 CDR 来制备 (例如 Pascalis 等人, J.Immunol.169 :3076, 2002)。在科学文献中已记载过很多抗体,其中对于结合,可以省却 1 个或 2 个 CDR。Padlan 等人, FASEB Journal9 :133-139(1995) ;Vajdos 等人, Journal of Molecular Biology, 320 :415-428(2002) ;Iwahashi 等人, Mol.Immunol.36 :1079-1091, (1999) ;Tamura 等人, Journal of Immunology,164 :1432-1441(2000)。类似地,仅掺入 CDRs 的一部分,即结合所需的 CDR 残基子集 (称作 SDR),到人源化抗体中可能是必要的。

[0038] 可以基于先前的研究 (例如 CDRH2 中的残基 H60-H65 通常是不需要的),通过分子建模和 / 或根据经验,或如 Gonzales 等人, Mol.Immunol.41 :863,2004 所述,从位于 Chothia 超变环之外的 Kabat CDR 区域中鉴定不接触抗原且不在 SDR 中的 CDR 残基。如果省略 CDR 或其残基,那么其通常用在人受体序列中占据相应位置的氨基酸置换,从而供给

可变区构架序列。待包括的此类置换的数目反映竞争考虑的平衡。此类置换对减少人源化抗体中的小鼠氨基酸的数目以及由此减少潜在的免疫原性，可能是有益的。然而，置换也可能引起亲和性的变化，优选避免亲和性的显著减少。也可根据经验选择 CDR 中置换的位置以及待置换的氨基酸。

[0039] 在上文提及的用于在人源化抗体中保留高结合亲和性的第一结构要素中，通过在很多已知的人抗体中适当地选择受体抗体，选择人源化抗体的重链可变区的构架，使得与供体抗体的重链可变区的构架具有最高序列同一性 (65％～95％)。在第二结构要素中，在构建人源化抗体时，依照规定的规则，将人受体抗体的构架中的选定氨基酸 (CDR 之外) 用来自供体抗体的相应氨基酸取代。具体来说，选择构架中待取代的氨基酸是以其与 CDR 相互作用的能力为基础的。例如，如在 3 维空间中测量，被取代的氨基酸可以在供体抗体序列中与 CDR 邻近，或在人源化抗体中位于 CDR 的 4-6 埃内。

[0040] 嵌合抗体是其中小鼠 (或其它啮齿类动物) 抗体的可变区与人抗体的恒定区组合的抗体；通过遗传工程的方法构建它们是众所周知的。此类抗体尽管约 2/3 为人的，但保留小鼠抗体的结合特异性。存在于小鼠、嵌合和人源化抗体中的非人序列的比例表明，嵌合抗体的免疫原性介于小鼠与人源化抗体之间。与小鼠抗体相比可以具有降低的免疫原性的其它遗传工程化抗体类型包括利用噬菌体展示方法 (Dower 等人，WO91/17271；McCafferty 等人，WO92/001047；Winter，WO92/20791；和 Winter，FEBSLett. 23：92，1998，其各自并入本文作为参考) 或使用转基因动物 (Lonberg 等人，WO93/12227；Kucherlapati WO91/10741，其各自并入本文作为参考) 制备的人抗体。

[0041] 如本文所用，术语″人样″抗体指的是 1 条或 2 条链的氨基酸序列的相当部分 (例如约 50％或以上) 源自人免疫球蛋白基因的 mAb。因此，人样抗体包括但不限于嵌合、人源化和人抗体。如本文所用，具有″降低的免疫原性″的 mAb 是当施用于人患者时预期具有比小鼠抗体显著更低的免疫原性的 mAb。此类抗体包括嵌合、人源化和人 mAb 以及通过取代小鼠抗体中可能对 B- 细胞或 T- 细胞表位作出贡献的特定氨基酸 (例如暴露的残基 (Padlan，Mol. Immunol. 28：489，1991)) 而制备的 mAb。如本文所用，″遗传工程化″ mAb 是已借助于重组 DNA 技术将其编码基因构建或放置到非天然环境中 (例如小鼠中或噬菌体上的人基因) 的 mAb，因而不包括例如用常规杂交瘤技术制备的小鼠 mAb。

[0042] mAb 的表位是与 mAb 结合的抗原的区域。两种抗体如果彼此一个竞争性抑制 (阻断) 另一个与抗原的结合，那么它们结合相同的或重叠的表位。也就是说，在竞争结合分析试验中测量时 (参见例如 Junghans 等人，CancerRes. 50：1495，1990)，1x、5x、10x、20x 或 100x 过量的一种抗体可以抑制另一种抗体的结合达至少 50％，但优选 75％、90％或甚至 99％。或者，如果两者抗体结合抗原的相同区域，或者如果抗原中导致一种抗体的结合减少或消除的基本上所有氨基酸突变都可以导致另一种抗体的结合减少或消除，则这两种抗体具有相同的表位。如果降低或消除了一种抗体的结合的某些氨基酸突变可以降低或消除另一种抗体的结合，那么这两种抗体具有重叠的表位。

[0043] 2. 中和性抗 -FGF2 抗体

[0044] 对于与 FGF2 结合的单克隆抗体 (mAb) (即抗 -FGF2mAb)，如果其结合部分地或完全地抑制了 FGF2 的一种或多种生物学活性 (即当 mAb 作为单一活性剂使用时)，则其被称为可以中和 FGF2，或是中和性的。中和性抗体可以抑制的 FGF2 生物学活性包括：FGF2 与 4 种

FGF 受体中的一种或多种结合的能力；刺激包括成纤维细胞、内皮细胞、Mv 1Lu 貂肺上皮细胞和各种人肿瘤细胞在内的某些细胞增殖（即促有丝分裂）的能力；刺激细胞例如内皮细胞的分化和迁移或刺激血管生成的能力，例如通过刺激人血管内皮细胞 (HUVEC) 增殖或管形成、或通过施加于鸡胚尿囊绒膜 (CAM) 时诱导血管而测量。

[0045] 当通过在实施例中描述的方法或本领域已知的方法进行测定时，浓度为例如 0.01、0.1、0.5、1、2、5、10、20 或 50μg/ml 的本发明中和性 mAb 抑制 FGF2 的生物学功能约至少 50％、但优选 75％、更优选 90％或 95％或甚至 99％、最优选约 100％（基本上完全抑制）。通常，在使用的 FGF2 的量刚好足以完全刺激生物学活性或者为 1、2 或 5ng/ml 或 0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、3 或 10μg/ml 时，测量抑制程度。优选地，mAb 当作为单一活性剂使用时是中和性的，即抑制生物学活性，但是任选地可以 2 种 mAb 一起使用以产生抑制。最优选地，mAb 中和不仅仅 1 种而是 2 种、3 种或几种上面列出的生物学活性；对本发明的目的而言，作为单一活性剂使用时中和 FGF2 的所有生物学活性的抗 -FGF2mAb 被称为“完全中和性的”，这种 mAb 是最优选的。本发明的 mAb 优选对 FGF2 具有特异性，即它们将不结合或仅仅以小得多的程度（例如小至少 10 倍）结合与 FGF2 有关的蛋白质，例如另一种 FGF 如 FGF1，和血管内皮生长因子 (VEGF)。本发明的某些 mAb 结合人 FGF2 和小鼠 FGF2，或结合人 FGF2 以及小鼠、大鼠、兔、鸡、狗和 / 或猴（例如食蟹猴）FGF2 中的 1 种、2 种或更多或所有。其它 mAb 对人 FGF2 具有特异性。本发明的 mAb 通常对 FGF2 的结合亲和性 (Ka) 为至少 10^7M^{-1}，但优选 10^8M^{-1} 或更高，最优选 10^9M^{-1} 或更高或甚至 $10^{10}M^{-1}$ 或更高。

[0046] 本发明的 mAb 包括天然四聚体形式的抗 -FGF2 抗体 (2 条轻链和 2 条重链)，可以是任何已知的同种型 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 及它们的亚型，即人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 和小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。本发明的 mAb 也意在包括抗体片段，例如 Fv、Fab 和 F(ab′)2；双功能杂交抗体（例如 Lanzavecchia 等人，Eur. J. Immunol. 17：105，1987）、单链抗体 (Huston 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：5879，1988；Bird 等人，Science 242：423，1988)；单臂抗体 (Nguyen 等人，Cancer 基因 Ther. 10：840，2003)；和恒定区改变的抗体（例如美国专利号 5，624，821）。mAb 可以是动物来源（例如小鼠、大鼠、仓鼠或鸡），或者它们可以被遗传工程化。啮齿动物 mAb 可以通过本领域众所周知的标准方法来制备，包括用适当佐剂中的 FGF2 通过腹膜内、静脉内或脚垫内进行多次免疫，然后提取脾脏或淋巴结细胞，并与适合的永生化细胞系融合，然后筛选产生结合 FGF2 的抗体的杂交瘤，例如参见下面实施例。通过上面述及的本领域已知方法制备的嵌合和人源化 mAb 是本发明的优选实施方案。人抗体，例如通过噬菌体展示或转基因小鼠方法制备的人抗体，也是优选的（参见例如 Dower 等人，McCafferty 等人，Winter，Lonberg 等人，Kucherlapati，同上）。

[0047] 下文所述的中和性抗 -FGF2mAb GAL-F2 是本发明的实施例。一旦具有本文所述的中和 FGF2 的期望性质的单个原型抗 - 人 -FGF2mAb 例如 GAL-F2 已被分离，那么通过使用本领域已知方法产生具有类似性质的其它 mAb 是简单的。例如，可以如上所述用 FGF2 免疫小鼠，产生杂交瘤，并且对所得 mAb 与原型 mAb 竞争结合 FGF2 的能力进行筛选。也可以用含有与 GAL-F2 结合的表位的更小 FGF2 片段，免疫小鼠。可以通过例如筛选与跨 FGF2 的一系列重叠肽的结合来定位该表位。或者，Jespers 等人，Biotechnology 12：899，1994（其并入本文作为参考）的方法可以用于指导选择与原型 mAb 例如 GAL-F2 具有相同表位因而具有类似性质的 mAb。采用噬菌体展示法，首先将原型抗体的重链与一个（优选人）轻链库进

行配对来选择FGF2-结合性mAb，然后将新轻链与一个（优选人）重链库进行配对来选择与原型mAb具有相同表位的（优选人）FGF2-结合性mAb。或者GAL-F2的变体可以通过对得自杂交瘤的编码GAL-F2的重链和轻链的cDNA进行诱变而获得。

[0048] 与GAL-F2具有相同或重叠表位的中和性mAb（例如与GAL-F2竞争结合FGF2的中和性mAb）提供了其它实施例。GAL-F2的嵌合或人源化形式是特别优选的实施方案。本发明还包括在重链和/或轻链可变区的氨基酸序列上与GAL-F290％、95％或99％相同且保持其功能性质的mAb、和/或与GAL-F2相差少数个功能上不重要的氨基酸置换（例如保守性置换）、缺失或插入的mAb。还包括具有与GAL-F2的相应CDR 90％、95％或99％或100％相同的至少1个CDR、优选所有6个CDR的mAb。在这里以及在本申请的其它地方，序列同一性百分比用通过Kabat编号规则进行最大比对的抗体序列来确定。在比对后，如果主题抗体区域（例如重链或轻链的整个成熟可变区）与参考抗体的相同区域正被相比，那么主题与参考抗体区域之间的序列同一性百分比是在主题与参考抗体区域两者中被相同氨基酸占据的位置的数目除以两个区域的比对位置的总数（不算空位），再乘以100转化为百分比。

[0049] 可以由杂交瘤生产本发明的天然mAb。遗传工程化mAb例如嵌合或人源化mAb可以通过多种本领域已知的方法来表达。例如，编码其轻链和重链V区的基因可以由重叠寡核苷酸合成，并与可得C区一起插入到表达载体（例如，可从Invitrogen商购）中，所述表达载体提供必要的调控区例如启动子、增强子、plyA位点等。优选使用CMV启动子-增强子。然后使用各种众所周知的方法例如脂转染或电穿孔，将表达载体转染到各种哺乳动物细胞系例如CHO或非生产性骨髓瘤（包括Sp2/0和NS0）中，并且通过适合的抗生素筛选来选择表达抗体的细胞。参见例如，美国专利号5,530,101。更大量的抗体可以通过在商购的生物反应器中生长细胞来产生。

[0050] 本发明的mAb或其它抗体一旦被表达，可以根据本领域的标准程序进行纯化，例如微滤、超滤、蛋白A或G亲和色谱法、尺寸排阻色谱法、阴离子交换色谱法、阳离子交换色谱法和/或基于有机染料的其它亲和色谱形式等。对于药物应用来说，具有至少约90或95％同质性的基本上纯的抗体是优选的，98％或99％或以上的同质性是最优选的。

[0051] 3. 治疗方法

[0052] 本发明提供了治疗方法，其中将本发明的mAb（例如抗-FGF2）施用于患有疾病（治疗疗法）或处于疾病发生或复发的危险中（预防疗法）的患者。术语″患者″包括人患者；兽患者，例如猫、狗和马；家畜，例如牛、羊和猪；和用于试验目的的实验室动物，例如小鼠和大鼠。该方法特别适合于治疗人患者。治疗人患者的方法中所用的mAb与人FGF2蛋白结合，所述人FGF2蛋白的序列由例如Ornitz等人，Genome Biol.2:3005.1,2001或Okada-Ban等人，Int.J.Biochem.Cell.Biol.32:263,2000以及Swiss-Prot数据库的Locus P09038提供。针对人蛋白的mAb还可用于其它物种，其中该物种同源物与该人蛋白具有抗原交叉反应性。在缺乏这种交叉反应性的物种中，使用对存在于该物种中的物种同源物具有适当特异性的抗体。然而，在实验室动物的异种移植物实验中，通常使用对由异种移植物表达的人蛋白具有特异性的mAb。

[0053] 在一个优选的实施方案中，本发明提供了含有本文所述的抗体的药物制剂。该抗体的药物制剂在生理可接受的载体中含有mAb，任选带有赋形剂或稳定剂，采用冻干形式或

水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受体没有毒性，并包括 pH 通常为 5.0 ～ 8.0、最通常为 6.0 ～ 7.0 的缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐或乙酸盐；造成等渗的盐例如氯化钠、氯化钾等；抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水性聚合物例如聚山梨醇酯 80、氨基酸、碳水化合物、螯合剂、糖类，以及其它本领域技术人员已知的标准成分（《雷明顿药物科学》(Remington′ s Pharmaceutical Science) 第 16 版，Osol，A. 编辑 . 1980）。mAb 通常以 1-100mg/ml 的浓度存在，例如 10mg/ml。

[0054] 在另一个优选的实施方案中，本发明提供了使用药物制剂中的抗 -FGF2mAb 治疗患者疾病的方法。制备成药物制剂的 mAb 可以通过任何适当的途径、特别是通过静脉内输注或者肌内或皮下推注的胃肠外途径施用于患者。静脉内输注可以在少至 15 分钟内给予，但是更通常进行 30 分钟，或历经 1、2 或甚至 3 小时。mAb 也可以被直接注射到疾病部位（例如肿瘤）中，或包囊在携带剂如脂质体中。给予的剂量足以至少部分减轻所治疗的病症（″ 治疗有效剂量 ″），任选为 0.1 ～ 5mg/kg 体重，例如 1、2、3 或 4mg/kg，但是可以高达 10mg/kg 或甚至 15、20 或 30mg/kg。也可以给予固定的单位剂量，例如 100、200、500、1000 或 2000mg，或剂量也可以基于患者的表面积，例如 1000mg/m^2。通常施用 1 ～ 8 个剂量（例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个剂量）来治疗癌症，但是也可以给予 10、20 个或更多的剂量。mAb 可以根据例如 mAb 的半衰期，以每天、一周两次、每周、每两周、每月、或某些其它的时间间隔，施用 1 周、2 周、4 周、8 周、3-6 个月或更长时间、或直到疾病进展。对于长期施用来说，重复的治疗过程也是可能的。

[0055] 可以有效地至少部分减轻存在于待治疗患者中的疾病的剂量、施用频率和施用途径的组合，被称作是治疗有效方案。有效地抑制或延缓患者疾病发作的剂量、施用频率和施用途径的组合，被称作是预防有效方案。

[0056] 对于使用本发明的抗 -FGF2mAb 治疗特别敏感的疾病包括据认为需要血管生成或与 FGF2 水平升高有关或与 FGF2 表达有关的实体肿瘤。适合于用抗 -FGF2mAb 治疗的此类肿瘤包括例如卵巢癌、乳腺癌、肺癌（小细胞或非小细胞）、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌、或肝癌、头颈部肿瘤、黑素瘤、肉瘤、癌和脑瘤（例如神经胶质瘤例如胶质母细胞瘤）。恶性血液病例如白血病和淋巴瘤和多发性骨髓瘤也可对此类治疗敏感。适合于用本发明的抗 -FGF mAb 治疗的其它与血管生成有关的疾病包括年龄相关性黄斑变性 (AMD)、糖尿病性视网膜病变、新生血管性青光眼和其它眼睛疾病；银屑病和其它皮肤疾病；和类风湿性关节炎。

[0057] 在一个优选的实施方案中，抗 -FGF2mAb 与其它疗法组合（即一起，也就是说，之前、期间或之后）施用。例如，为治疗癌症，抗 -FGF2mAb 可以与任何一种或多种已知的化疗药物一起施用，例如烷化基，例如卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、卡铂、奥沙利铂、丙卡巴肼和环磷酰胺；抗代谢药例如氟尿嘧啶、氟脲苷、氟达拉滨、吉西他滨、氨甲喋呤和羟基脲；天然产物，包括植物生物碱和抗生素例如博来霉素、多柔比星、柔红霉素、伊达比星、依托泊苷、丝裂霉素、米托蒽醌、长春花碱、长春花新碱和泰素 (Taxol，紫杉醇）或相关的化合物例如**Taxotere®**；拓扑异构酶 1 抑制剂伊立替康；特别批准用于脑肿瘤的药剂，包括替莫唑胺和含有卡莫司汀的**Gliadel®** wafer；酪氨酸激酶抑制剂例如**Gleevec®**（甲磺酸伊马替尼）、**Sutent®**（苹果酸舒尼替尼）、**Nexavar®**（索拉非尼）、**Tarceva®**（埃罗替尼）和**Iressa®**（吉非替尼）；血管生成抑制剂；以及在 WO 2005/017107A2（在此并入本文作为

参考）中列出的所有被批准的和实验的抗癌药。抗 -FGF2mAb 可以与用于标准化疗方案的这些其它药剂中的 1、2、3 种或更多种组合使用。通常，该其它药剂是早就已知对正在治疗的特定癌症类型有效的那些药剂。抗 -FGF2mAb 尤其可以用于克服对化疗药物的耐药性，因而增加其有效性（参见 Song 等人 Proc. Natl. Acad. Sci USA 97 :8658, 2000）。

[0058] 为治疗癌症可以与抗 -FGF2mAb 一起施用的其它药剂包括生物药例如单克隆抗体，包括针对 HER2 抗原的 Herceptin™；针对 VEGF 的**Avastin®**；或针对表皮生长因子 (EGF) 受体的抗体例如**Erbitux®**（西妥昔单抗）和**Vectibix®**（帕尼单抗）。尤其优选针对肝细胞生长因子 (HGF) 的抗体与抗 -FGF2mAb 一起使用，包括 mAb L2G7(Kim 等人，Clin Cancer Res12 :1292, 2006 和美国专利号 7,220,410)、特别是其嵌合和人源化形式例如 HuL2G7(WO 07115049A2)；在 WO 2005/017107A2 中、特别是在 2.12.1 中所述的人抗 -HGF mAb；和在 WO 07143090A2 或 WO 07143098A2 中所述的 HGF 结合蛋白；以及其它与任意前述 mAb 竞争结合的中和性抗 -HGF mAb。与 HGF 的 cMet 受体结合的 mAb 也是优选的，例如已被遗传工程化成仅含有一个″臂″，即结合结构域，的抗 -cMet mAbOA-5D5(Martens 等人，Clin. Cancer Res. 12 :6144, 2006)。而且，抗 FGF2mAb 可以与任何形式的外科手术和 / 或放射疗法，包括外线束放射、调强放射疗法 (IMRT) 和任何形式的放射外科手术例如伽玛刀，一起使用。

[0059] 包括抗 -FGF2mAb 抗体的治疗（例如标准化疗），与不使用抗 -FGF2mAb 的同样治疗（例如化疗）相比，可以通过增加癌症患者的中位无进展存活时间或总存活时间至少 30％或 40％，但是优选 50％、60％至 70％或甚至 100％或以上来减轻疾病。此外或备选地，包括抗 -FGF2mAb 的治疗（例如标准化疗），与不使用抗 -FGF2mAb 的同样治疗（例如化疗）相比，可以增加患有这些肿瘤（例如卵巢癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和胶质母细胞瘤，特别是在复发或难治疗的时候）的患者的完全应答率、部分应答率或客观应答率（完全 + 部分）至少 30％或 40％，但是优选 50％、60％至 70％或甚至 100％。

[0060] 通常，在临床试验中（例如 II 期、II/III 或 III 期临床试验），上面提到的与接受仅化疗（或加上安慰剂）的患者的对照组相比，用化疗加上抗 -FGF2mAb 治疗的患者的中位无进展存活和 / 或应答率的增加，是有统计学意义的，例如在 $p = 0.05$ 或 0.01 或甚至 0.001 水平上。完全和部分应答率通过癌症临床试验中常用的客观标准（例如美国国家癌症研究所和 / 或美国食品与药品管理局所列出的或接受的客观标准）来确定。

[0061] 4. 其它方法

[0062] 本发明的抗 -FGF2mAb 也在诊断、预后和实验室方法中有用。它们可以用于测量肿瘤中或肿瘤患者的循环中 FGF2 的水平，以确定是否该水平是可测量的或甚至升高的，从而跟踪并指导肿瘤的治疗，这是因为与可测量的或升高的 FGF2 水平有关的肿瘤将对于使用抗 -FGF2mAb 的治疗是最敏感的。例如，与高水平 FGF2 有关的肿瘤将对于使用抗 -FGF2mAb 的治疗特别敏感。在特定的实施方案中，mAb 可以用于 ELISA 或放射性免疫分析，以测量例如肿瘤活检标本或血清中或 FGF2 分泌性细胞的细胞培养物的培养基上清液中的 FGF2 水平。使用与不同表位结合（即非竞争结合）的两个抗 -FGF2mAb 将在开发检测 FGF2 的灵敏性″三明治″ ELISA 中特别有用。对于各种分析方法来说，mAb 可以用荧光分子、自旋标记分子、酶或放射性同位素进行标记，并且可以以带有所有进行 FGF2 分析所必需的试剂的试剂盒形式供应。在其它应用中，抗 -FGF2mAb 可以用于例如通过亲和色谱法纯化 FGF2。

实施例

[0063] 实施例 1 :试剂和分析试验

[0064] GST-FGF2、FGF2-Fc 和 FGF2-Flag 的制备。合成人 FGF2 的 cDNA 序列 (具有 155 个氨基酸的前体形式 ;Sommer 等人,1987)(GenScript, Inc),进行 PCR 扩增,并克隆到 pDisplay 载体 (Invitrogen) 的衍生物中。将这些质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞,使用 1mM IPTG 诱导 FGF2 表达。FGF2 表达的水平用 FGF2 特异性 ELISA 试剂盒 (R&D Systems) 来测定 ;如所述 (Wiedlocha 等人, Mol.Cell Biol.16 :270,1996),用肝素 SepharoseCL-6B 珠 (Amersham Biosciences) 纯化 FGF2。FGF2 分别与谷氨酰胺合成酶 (GST-FGF2)、Flag 肽 (FGF2-Flag) 和人 IgG1Fc 结构域 (氨基酸 216 至 446 ;FGF2-Fc) 的融合蛋白 (其用于 FGF2/FGFR 结合分析试验以及用于免疫),用标准分子生物学技术由适当的遗传构建体,类似地制得。GST-FGF2 用抗 -GST 柱纯化, FGF2-Fc 用蛋白 A/G 柱纯化,而在测定 FGF2-Flag 浓度之后使用培养物上清液中的 FGF-Flag。此外,购买纯化的人 FGF2(QEDBioscience Inc.) 和鼠 FGF2(ProSpec-Tany Technogene Ltd.)。

[0065] FGFR-Fc 蛋白的制备。人 FGFR1α (IIIc)(被命名为 FGFR1c) 和人 FG FR2Cα (IIIc)(被命名为 FGFR2c) 的胞外结构域 (ECD) 被表达成免疫粘附素分子。将编码 FGFR1c 和 FGFR2c 的整个 ECD 的 DNA 片段通过多肽接头与人 Fc 融合。通过转染人 293F 细胞、在 293 表达培养基 (Invitrogen) 中在 G418(1mg/ml) 的存在下选择稳定的 293 转染子,表达这些 FGFR-Fc 分子。使用蛋白 A/G 柱纯化由 293F 转染细胞分泌的 FGFR-Fc。此外,人 FG FR3c-Fc 和人 FGFR4-Fc 融合物得自 R&D Systems。

[0066] FGF2 片段的合成。通过 SynBioSci 合成了由 FGF2 的氨基酸残基 29-44(肽 #1)、101-118(肽 #3) 和 137-155(肽 #4) 组成的肽。额外的半胱氨酸残基被加至肽 #1 与 #3 的 C- 末端和肽 #4 的 N- 末端。然后将这些肽片段与钥孔戚血兰蛋白 (KLH) 缀合。

[0067] FGF2 结合性 ELISA。在 4℃将 ELISA 孔用 50μg/ml 肝素 (Sigma) 包被过夜,然后在室温 (RT) 与 0.3-1μg/ml 人或小鼠 FGF2 孵育 1 小时,以使肝素能捕获 FGF2。在 RT 用 2% BSA 封闭 1 小时后,在 RT 加入杂交瘤培养物上清液或纯化过的 mAb 达 1 小时。通过在 RT 加入 HRP- 山羊抗 - 小鼠 IgG Fc 达 1 小时、然后洗涤、加入 TMB 底物 (Sigma) 并在 450nm 读数,检测结合的抗 -FGF2 抗体。

[0068] FGFR-Fc/FGF2-Flag 结合性 ELISA。在 FGFR-Fc/FGF2-Flag 结合性 ELISA 中测定抗 -FGF2mAb 的阻断活性。在 4℃将 ELISA 孔用 2μg/ml 对人 IgG-Fc 具有特异性的山羊抗体包被过夜。在 RT 用 2% BSA 封闭 1 小时后,将各孔用 0.Sμg/ml FGFR1c-Fc、FGFR2c-Fc、FGFR3c-Fc 或 FGFR4-Fc 孵育 1 小时。在洗涤后,在各种浓度的 mAb 的存在下各孔用 FGF2-Flag(0.2μg/ml) 孵育 1 小时。通过加入 HRP- 抗 -Flag M2 抗体 (Sigma) 来检测结合的 FGF2-Flag。

[0069] 实施例 2 :单克隆抗体的产生

[0070] Balb/c 小鼠 (5-6 周龄,雌性) 通过下述进行免疫 :如下表所示,在小鼠后脚垫中,用重新悬浮于 MPL/TDM(Sigma-Aldrich) 中的 GST-FGF2、FGF2-Fc 和 / 或 KLH 缀合的 FGF2 合成肽,按 1 周的间隔注射 14 次。最后一次注射后 3 天,使用标准融合方法用 35%聚乙二醇将腿弯部的淋巴细胞与 P3/X63-Ag8U1 小鼠骨髓瘤细胞融合,方法如所述 (Chuntharapai

等人，Methods Enzymol 288 :15，1997)。融合后 10 天，利用上述的 FGF2 结合性 ELISA 对杂交瘤培养物上清液结合 FGF2 的能力进行筛选。然后在 FGFR1-Fc/FGF-Flag 结合性 ELISA 中对选择的 mAb 的阻断活性进行筛选。然后用有限稀释技术，如所述 (Harlow 等人，1988)，将所选杂交瘤克隆两次。

[0071] 表 :免疫方案

[0072]

注射次数	抗原 (在 MPL/TDM 中) / 脚垫
1	GST-FGF210μg
2	GST-FGF25μg
3	GST-FGF22.5μg
4-7	GST-FGF25μg
8-9	GST-FGF210μg
10	GST-FGF2(5μg)+FGF2-Fc(5μg)
11	FGF2-Fc(2μg)+ 肽 #1&#3(2μg)
12	FGF2-Fc(2μg)+ 肽 #1，#3&#4(3μg)
13	FGF2-Fc(2μg)+ 肽 #1，#3&#4(3μg)
14	FGF2-Fc 2μg

[0073] 图 1 显示，用这种方法产生的 mAb GAL-F2 近乎同等良好地与人 FGF2 和小鼠 FGF2 结合，而阴性对照小鼠 IgG mAb 不与 FGF2 结合。图 2 显示，GAL-F2、而不是对照 mAb 5G8 能抑制人 FGF2 与 4 种 FGF 受体 FGFR1-4 之每种的结合。在使用上述的 FGFR-Fc/FGF2-Flag 结合性 ELISA 的另一个实验中，GAL-F2 (以 10μg/ml 的浓度) 完全抑制了 FGF2 与 4 种 FGFR——FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4——之每种的结合，即，将信号降低到在实验误差内的背景水平，而抗 -FGF2mAb bFM-1 和 3H3 使结合大幅度但未完全降低。

[0074] 实施例 3 :GAL-F2 的表位

[0075] 购买了已报导具有某些中和活性的数种市售可得的抗 -FGF2mAb-3H3(Calbiochem)、mAb bFM-1(Millipore) 和 mAb FB-8(Abcam)。进行竞争结合 ELISA，以确定是否 GAL-F2 具有与任何这些 mAb 相同的表位。将 ELISA 板用 50μl/ 孔肝素 (50μg/ml) 包被过夜，轻轻倒出，用 50μl/ 孔 FGF2 孵育 1 小时。用 2% BSA 封闭后，在待测试的不同浓度的各抗 -FGF2mAb 的存在下用 0.5μg/ml 生物素化 GAL-F2mAb 孵育各孔。通过加入 HRP- 链霉亲和素、然后加入 TMB 底物来检测各孔中与 FGF2 结合的生物素化 GAL-F2 的水平。图 3 显示，虽然当然 GAL F2 与自身竞争，但是 mAb 3H3、bFM-1 和 FB-8 以及

阴性对照小鼠 mAb(mIgG) 无一与 GAL-F2 竞争结合 FGF2。因此,所测试的已有抗 -FGF2mAb 无一与 GAL-F2 在 FGF2 上具有相同或重叠的表位。

[0076] 实施例 4 :GAL-F2 抑制 FGF2 诱导的增殖

[0077] 将 BaF3 细胞 (DSMZ,Germany) 保持在补充有 10％ FCS、10％ WEHI-3 条件培养基和抗生素的 RPMI 1640 培养基 (GIBCO) 中。如所述 (Ornitz 等人,1996),通过线性化 FGFR1c 和 FGFR2c 表达载体 DNA 的电穿孔,产生稳定的 FGFR1c 或 FGFR2c 表达性 Ba/F3 细胞。使用 G418(600μg/ml) 对稳定的转染细胞进行 10 天选择。表达 FGFR1c 或 FGFR2c 的稳定 Ba/F3 转染子显示出在缺乏 WEHI-3 培养基下响应于 FGF2 而增殖。为了测定 GAL-F2mAb 的阻断 (中和) 活性,洗涤 FGFR1c- 或 FGFR2c- 表达性 BaF3 细胞 (10,000 细胞 / 孔),在各种浓度的 GAL-F2 的存在下将其重新悬浮于具有 10％ FCS+2μg/ml 肝素和 20ng/ml FGF-2 的 RPMI 中。在 37℃和 5％ CO2 孵育 36-48 小时后,通过加入 WST-1(RocheApplied Science)2 小时,测定增殖水平。图 4 显示,GAL F2 抑制 FGF2 诱导的增殖,在 10μg/ml mAb 时达到几乎完全抑制。

[0078] 使用 Mv 1Lu 貂肺上皮细胞 (来自 ATCC 的 CCL-64) 测定 GAL-F2 在正常上皮细胞上的阻断活性。将生长于含有 10％ FCS 的 DMEM 中的 Mv1Lu 细胞 (2×10^3 细胞 /100μl/ 孔) 重新悬浮于无血清 DMEM 中,在各种浓度的 mAb 的存在下用 1-2ng/ml FGF2+1ng/ml TGF-β (以抑制背景增殖) 刺激 24 小时。通过加入 WST-1(Roche Applied Science)24 ～ 48 小时来测定细胞增殖的水平。图 5 显示,GAL-F2 抑制 FGF2 诱导的 Mv 1Lu 细胞的增殖,在 1μg/ml mAb 时几乎完全抑制。在类似的实验中,GAL-F2 抑制由 10ng/ml FGF2 诱导的 HUVEC 增殖,在 0.1μg/ml 的浓度时 (即在与 FGF2 约等摩尔比值时) 抑制约 75％,而在 1.0μg/ml 的浓度时完全抑制。这有几分好于 bFM-1 抗 -FGF2mAb 的抑制程度,明显好于 3H3 抗 -FGF2mAb,并且表明 GAL-F2 抑制血管生成,因为内皮细胞的增殖是血管生成的必要步骤。

[0079] 实施例 5 :产克隆试验

[0080] 通过 GAL-F2 对软琼脂中人肿瘤细胞的集落形成的影响,对 GAL-F2 的抗 - 肿瘤活性进行了体外研究。如下进行试验 :用在含有 10％ FCS 的 DMEM 中的 1.5ml/ 孔 0.6％琼脂包被 6 孔板,然后层叠上在含有 10％ FCS 的 DMEM 中的 1.5ml 0.3％琼脂。将上层琼脂与 2×10^4SMMC-7721 人肝瘤细胞 +10μg/ml mAb 混合。在 37℃、在潮湿培养箱中将板孵育 10 至 14 天,然后用 0.005％结晶紫染色 1 小时,经显微照相术检查。图 6 显示,与存在无关对照小鼠 IgG mAb 时的细胞相比,存在 GAL-F2 时的细胞形成了很多更少的集落,而 bFM-1 抗 -FGF2mAb 并未使集落数目减少。因此,GAL-F2 抑制软琼脂中人肿瘤细胞的集落形成。

[0081] 实施例 6 :血管生成测定试验

[0082] 在 BALB/c 小鼠中后背注射含有或未含 30ng FGF2 和 / 或 3μg GAL-F2 的 0.4ml Matrigel(BD Biosciences),测定了 GAL-F2 的抗 - 血管生成活性。第 6 天收获 Matrigel 样本 (plug) 用于摄影术。在此测定试验中 FGF2 刺激血管形成,然而 GAL-F2 至少部分抑制了这种刺激作用。

[0083] 实施例 7 :异种移植物模型

[0084] 如先前所述 (Kim 等人,Nature 362 :841,1993),进行异种移植物实验。在 HBSS 中收集通常生长于完全 DMEM 培养基中的人肿瘤细胞。用 0.1mlHBSS 中的 2 ～ 10×10^6 个细胞在背部区域中对雌性无胸腺裸鼠或 NIH-IIIXid/Beige/ 裸鼠 (4-6 周龄) 进行皮下注射。

当肿瘤尺寸达到50-100mm^{3}时，将小鼠随机分组，每周两次以0.1ml的体积腹膜内施用5mg/kg（总共100μg）mAb。每周通过测量两个维度［长度(a)和宽度(b)］两次来确定肿瘤尺寸。根据V＝ab2/2计算肿瘤的体积，其被表示为平均肿瘤体积±SEM。每个处理组中的小鼠数目通常为5-7个小鼠。可以例如使用Student t检验进行统计学分析。

[0085] 图7显示，GAL-F2强烈地抑制RPMI 4788结肠瘤异种移植物的生长，而图8显示，bFM-1抗-FGF2mAb抑制异种移植物生长的程度小于GAL-F2。图9显示，GAL-F2抑制Xid/Beige/裸鼠中的SMMC-7721肝瘤异种移植物，而每周1次5mg/kg的化疗药顺铂抑制异种移植物生长的程度较小。GAL-F2与顺铂的组合比单独任一种药剂的抑制作用更强，显示这些药剂的加和效应或协同效应。图10显示，GAL-F2比**Erbitux®**所源自的抗-EGF受体mAb M225更强地抑制裸鼠中的HepG2肝瘤异种移植物，但是GAL-F2与M225的组合比任单一种药剂的抑制作用都强些，再次显示这些药剂的加和效应或协同效应。但是，GAL F2不能抑制所测试的所有异种移植物的生长，这可能是因为它们的生长不依赖于FGF2。

[0086] 实施例8：GAL-F2的人源化

[0087] 使用分子生物学的标准方法，进行GAL-F2mAb的轻链和重链可变区的克隆、嵌合mAb的构建和表达、以及人源化GAL-F2mAb的设计、构建、表达和纯化，例如如美国专利申请11/731,774中针对L2G7mAb所述的方法，所述专利申请为了所有目的并入本文作为参考。GAL-F2的（成熟）轻链和重链可变(V)区的氨基酸序列分别示于图11A和11B，顶行标记GAL-F2。更具体地，为了设计人源化GAL-F2mAb，通常遵照Queen等人、美国专利号5,530,101和5,585,089的方法。人Vκ序列ABA70776和VH序列AAL04519分别示于图11A和11B（末行），它们分别被选择用作GAL-F2VL和VH序列的受体序列，因为它们与GAL-F2VL和VH序列具有特别高的构架同源性（即序列同一性）。使用计算机产生的GAL-F2可变结构域的分子模型来定位GAL-F2构架中与CDR足够靠近以致于有可能与CDR相互作用的氨基酸。为了设计人源化GAL-F2轻链和重链可变区，将来自小鼠GAL-F2mAb的CDR首先概念性地移植到受体构架区中。在计算机模型表明与CDR有明显接触、可能是维持CDR构象所需的构架位置上，用来自小鼠抗体的氨基酸取代人构架氨基酸。对于命名为HuGAL-F2的人源化GAL-F2mAb来说，使用Kabat编号，这在重链的残基1、27和30（残基27和30在Chothia超变环H1中）、48、67、71和94上进行，而在轻链上没有残基进行这种取代。HuGAL-F2的轻链和重链V区序列分别示于图11A和11B，中间行标记HuGAL-F2，其中它们与相应的GAL-F2供体和人受体V区比对——CDR（按Kabat定义）用下划线标出，而上文列出的取代氨基酸用双下划线标出。

[0088] 本发明不仅提供了包括示于图11的轻链和重链V区的人源化GAL-F2mAb HuGAL-F2，而且提供变体人源化GAL-F2mAb，其轻链和重链可变区与HuGAL-F2的序列相差少数个（例如通常不超过1、2、3、5或10个）取代、缺失或插入——通常在构架中但也可以在CDR中。特别地，可以在受体构架中进行仅仅上述置换的子集，或者可以进行另外的置换，例如小鼠GAL-F2VH氨基酸69L可以取代受体氨基酸69I，或小鼠氨基酸可以在人源化轻链中于Kabat编号的位置1、3、60和/或67中的任一个或所有位置上取代相应的氨基酸。另一方面，VH氨基酸1E(GIu)可以被替换为Q(Gln)。实际上，HuGAL-F2中很多未与CDR接触的构架残基可以接受来自GAL-F2或其它小鼠或人抗体的相应位置的氨基酸的置换，甚至许多可能的CDR接触性残基也适于置换，或者甚至可以改变CDR中的氨基酸。CDR置换的

一个实例是用占据人受体序列（其用于提供可变区构架）相应位置的残基置换 CDR 中的残基。

[0089] 最为常见地，变体人源化 GAL-F2 序列中进行的置换就所取代的 HuGAL-F2 氨基酸而言是保守性的。可以如下分组氨基酸，以确定保守性置换，即，组内置换：I 组（疏水侧链）：met、ala、val、leu、ile；II 组（中性亲水侧链）：cys、ser、thr；III 组（酸性侧链）：asp、glu；IV 组（碱性侧链）：asn、Gln、his、lys、arg；V 组（影响链取向的残基）：gly、pro；和 VI 组（芳香族侧链）：trp、tyr、phe。

[0090] 优选地，HuGAL-F2 中的置换（不管是不是保守性的）对该人源化 mAb 的结合亲和性或效能（即其中和 FGF2 的生物学活性的能力）没有实质性影（例如，在一些或所有本文所述的测定试验中变体人源化 GAL-F2mAb 的效能与 HuGAL-F2 的效能基本上相同，即在实验误差内）。优选，成熟变体轻链和重链 V 区序列分别与 HuGAL-F2 成熟轻链和重链 V 区至少 90％、更优选至少 95％、最优选至少 98％相同。或者，与 GAL-F2 的可变区具有高序列同一性的其它人抗体可变区也适于提供人源化抗体构架，尤其是来自人 I 亚组的 κ V 区和来自人 I 亚组的重链 V 区，或这些亚组的共有序列。

[0091] 在其它人源化抗体中，与示例性抗体相关提及的受体到供体置换的位置（即 H1、H27、H30、H48、H67、H71 和 94）中，至少 1、2、3、4、5、6 个或所有 7 个优选被占据小鼠供体抗体重链的相应位置的残基所占据。如果重链受体序列不是 AAL04519，对于所述的特定可变构架区位置的占据，受体到供体的置换可能是或可能不是必须的，这取决于占据该所述位置的残基在受体与供体之间是否已经是相同的。

[0092] 这里讨论的示例性 mAb HuGAL-F2 具有人 κ 和 γ1 恒定区（例如如美国专利申请 11/731,774 中所示），因此是 IgG1。HuGAL-F2 的（成熟）轻链和重链的完全序列示于图 13。因此，示例性人源化抗体包括 SEQ ID NO：7 的轻链和 SEQ ID NO：8 的重链。尽管这些序列分别为 Km(3) 和 G1m(3) 同种异型，但是应理解的是，名称 HuGAL-F2 涵盖任何（IgG1、κ）同种异型的 IgG1mAb。还应理解的是，当通过常规操作制备 HuGAL-F2 时，在轻链和 / 或重链的氨基或羧基端上的 1 个至几个氨基酸，例如重链的 C- 末端赖氨酸，可以在一部分或所有分子中失去或被衍生化，并且此类组合物仍被名称 HuGAL-F2 所涵盖，被认为是人源化 GAL-F2mAb。其它同种型（例如 IgG2、IgG3 和 IgG4）的人源化 mAb 可以通过将 HuGAL-F2 可变区与适当人恒定区组合来制备。可以在 HuGAL-F2 恒定区中进行置换以减少或增加效应子功能例如补体介导的细胞毒性或 ADCC（参见例如，Winter 等人，美国专利号 5,624,821；Tso 等人，美国专利号 5,834,597；和 Lazar 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103：4005，2006），或者以延长在人中的半衰期（参见例如，Hinton 等人，J. Biol. Chem. 279：6213，2004）。特别地但非限制性地，在 IgG 恒定区中位置 250 突变为 Gln 和 / 或位置 428 突变为 Leu 的 HuGAL-F2 是本发明的实施方案。

[0093] 为了将 HuGAL-F2 的结合亲和性与小鼠 - 人嵌合 mAb ChGAL-F2 的结合亲和性相比较，使用标准 ELISA 技术进行了竞争结合实验。具体来说，将人 FGF2 固定在肝素包被的 ELISA 板上。在增加浓度的未标记 ChGAL-F2、HuGAL-F2 或对照人抗体 hIgG 的存在下用生物素化 GAL-F2mAb(0.5μg/ml) 孵育各孔。通过加入 HRP- 链霉亲和素和底物来测定所结合的生物素化 GAL-F2 的水平。如图 12 所示，HuGAL-F2 和 ChGAL-F2 接近同等良好地竞争，其中 HuGAL-F2 可能略好，说明 HuGAL-F2 对 FGF2 的结合亲和性至少与 ChGAL-F2 一样高，因而与

最初的小鼠 GAL-F2mAb 一样高。根据 HuGAL-F2 抑制标记的 mAb 的 50％结合所需的浓度，可以估计出 HuGAL-F2 对 FGF2 的结合亲和性 Ka 为至少约 10^9M^{-1}。也可以在任何生物测定试验中针对本文所述的 FGF2 活性，测试 HuGAL-F2，HuGAL-F2 将与 GAL-F2mAb 可比地抑制 FGF2 活性。

[0094] 尽管已经参考目前优选的实施方案对本发明进行了描述，但是应理解，可以作出各种修改而不背离本发明。除非与上下文明显不同，否则本发明的任何步骤、要素、实施方案、特征或方面可和任何其它的一起使用。所有引用的出版物、专利和专利申请（包括登录号等）为了所有目的以其全文在此并入作为参考，其程度等同于明确地且单独地指明每个单独的出版物、专利和专利申请为了所有目的以其全文在此并入作为参考。如果 1 个以上的序列与在不同时间与一个登录号相关，那么旨在指截止到 2008 年 5 月 29 日前与该登录号相关的序列。如果附图和序列表中的相应序列之间有任何不一致，则以附图为准。

[0095] 产生单克隆抗体 GAL-F2 的杂交瘤已经按照布达佩斯协议在 2008 年 1 月 8 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type CultureCollection，P.O.Box 1549Manassas，VA 20108)，ATCC 保藏号 PTA-8864。自该保藏机构收到提供保藏物样品的最近申请之后起为期至少 5 年，自保藏日起为期至少 30 年、或在相关专利的法律期限内（以最长的期限为准），该保藏在授权的保藏机构维持，并在突变、失活或毁坏时进行替换。对于公众获得这些细胞系的所有限制将在该申请被授予专利权时不可逆地消除。

[0001]

序列表

<110> 星系生物科技责任有限公司(Galaxy Biotech, LLC)

<120> 碱性成纤维细胞生长因子的单克隆抗体

<130> 022382-000820PC

<140> 尚未确定
<141> 尚未确定

<150> US 61/057,183
<151> 2008-05-29

<150> US 61/170561
<151> 2009-04-17

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>
<223> GAL-F2

<400> 1

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

[0002]

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<223> HuGAL-F2

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30
Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Tyr Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> 免疫球蛋白κ轻链可变区

<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0003]

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

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>
<223> GAL-F2

<400> 4
Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Val Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Glu Gly Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> HuGAL-F2

<400> 5

[0004]

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

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> 免疫球蛋白重链可变区

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Gly Gln Leu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0005]

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> HuGAL-F2 抗体轻链

<400> 7

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

<210> 8
<211> 451
<212> PRT
<213> 人

[0006]

<220>

<223> HuGAL-F2 抗体重链

<400> 8

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30
Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Asn Asp Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Glu Gly Gly Gly Lys Tyr Val Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
```

[0007]

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

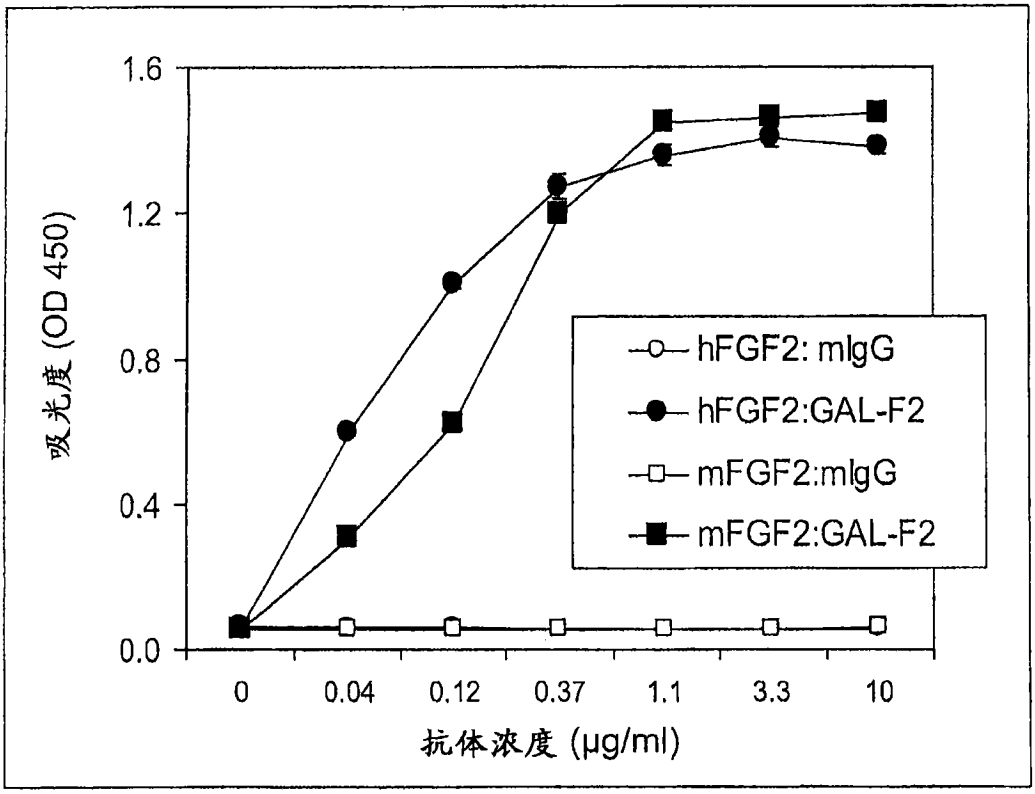

1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
吸光度 (OD 450)
0
0.04
0.12
0.37
1.1
3.3
10
抗体浓度 (μg/ml)
hFGF2: mIgG
hFGF2:GAL-F2
mFGF2:mIgG
mFGF2:GAL-F2

图 1

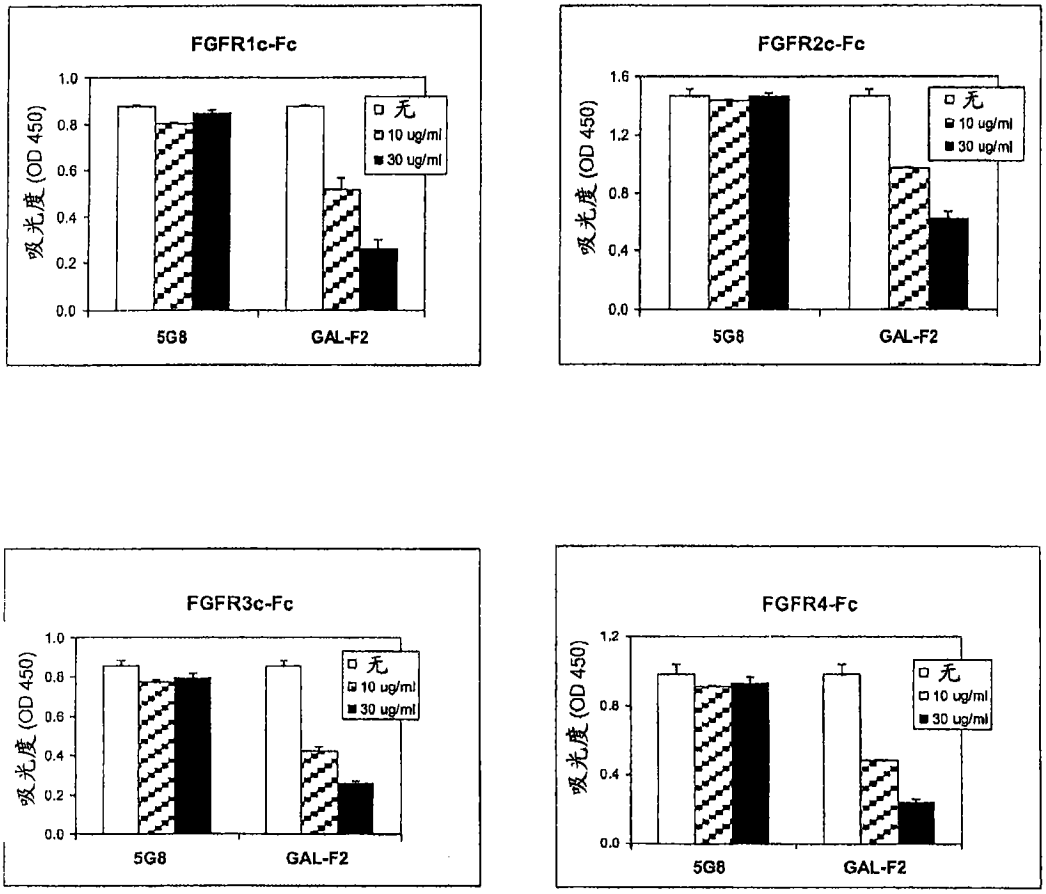

FGFR1c-Fc
FGFR2c-Fc
FGFR3c-Fc
FGFR4-Fc
吸光度 (OD 450)
无
10 ug/ml
30 ug/ml
5G8
GAL-F2

图 2

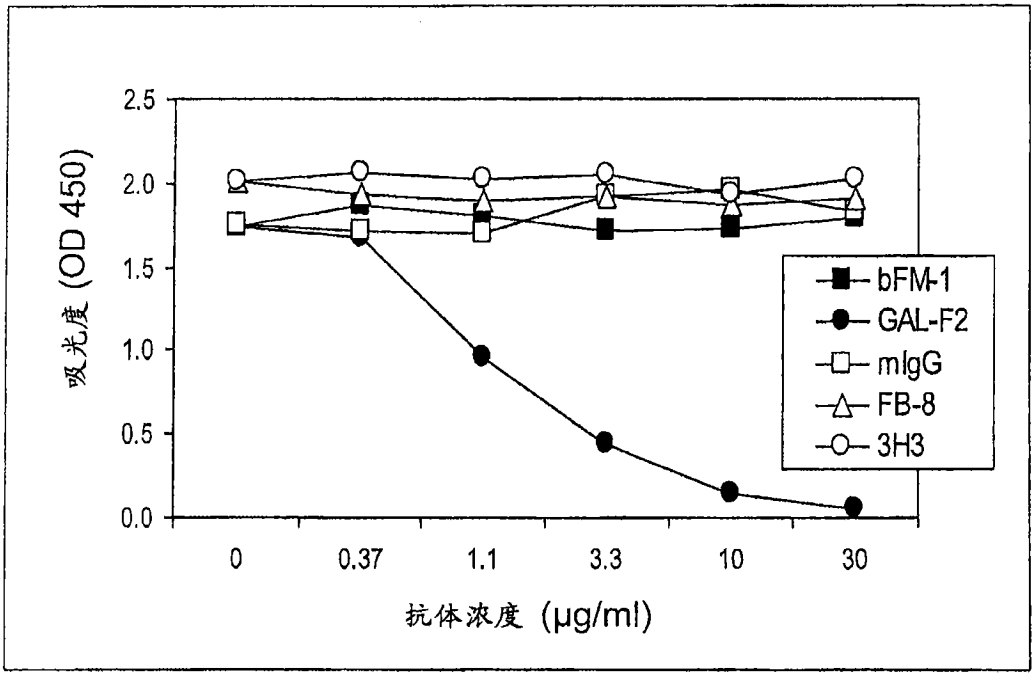
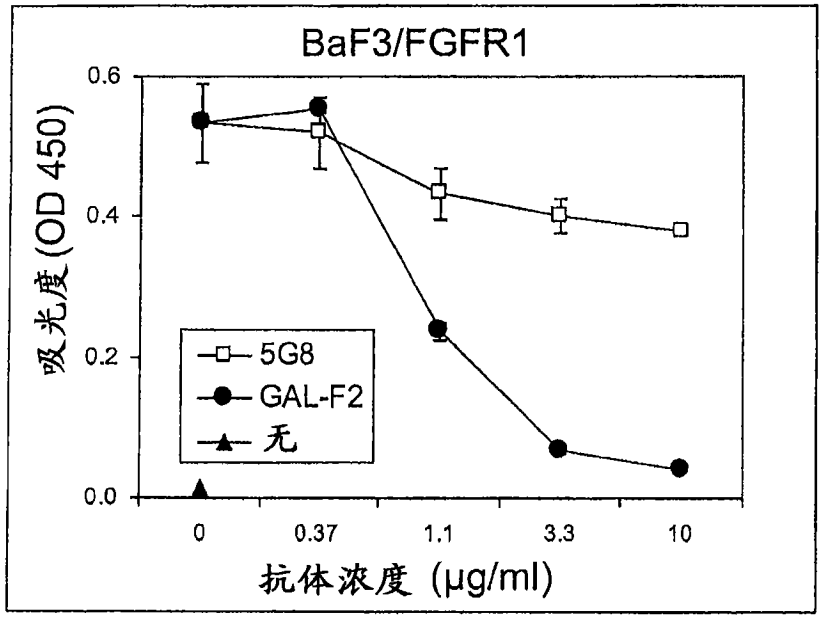

吸光度 (OD 450)
抗体浓度 (μg/ml)
bFM-1
GAL-F2
mIgG
FB-8
3H3

图 3


BaF3/FGFR1
吸光度(OD 450)
0.6
0.4
0.2
0.0
5G8
GAL-F2
无
0
0.37
1.1
3.3
10
抗体浓度 (μg/ml)

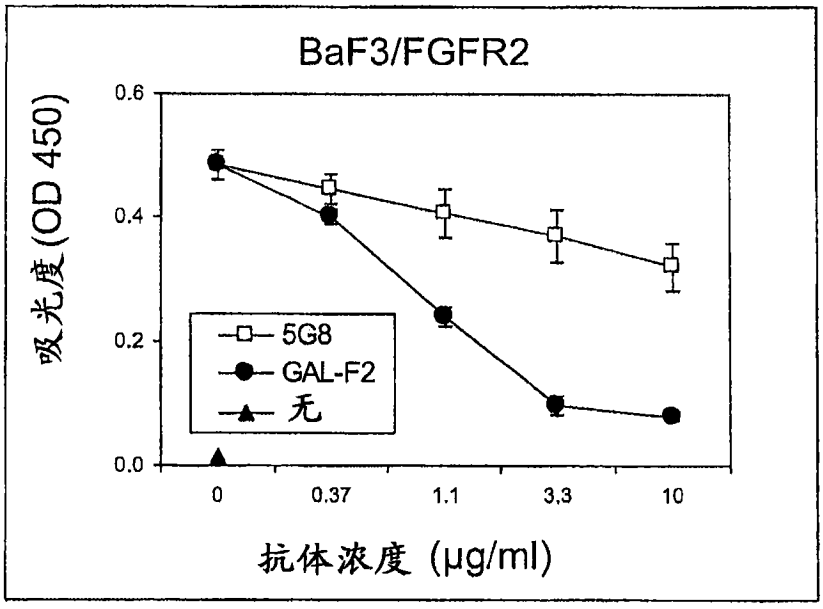

BaF3/FGFR2
吸光度(OD 450)
0.6
0.4
0.2
0.0
5G8
GAL-F2
无
0
0.37
1.1
3.3
10
抗体浓度 (μg/ml)

图 4

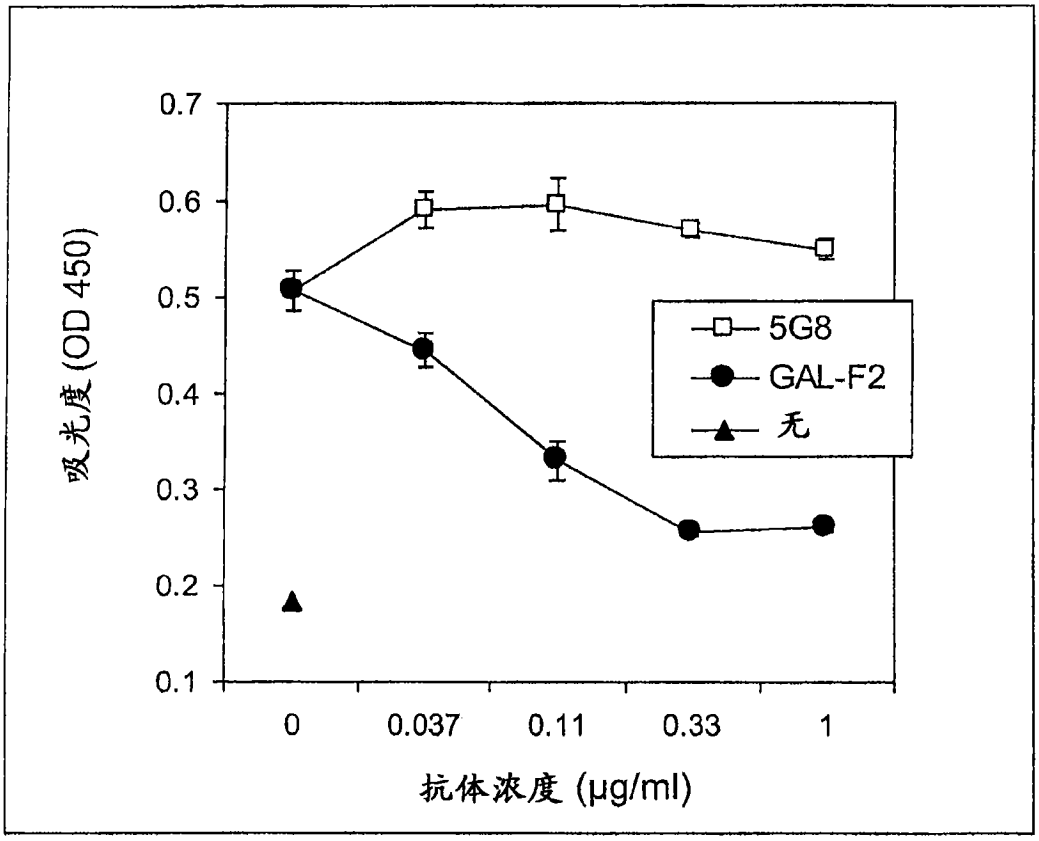

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
吸光度 (OD 450)
0
0.037
0.11
0.33
1
抗体浓度 (μg/ml)
5G8
GAL-F2
无

图 5

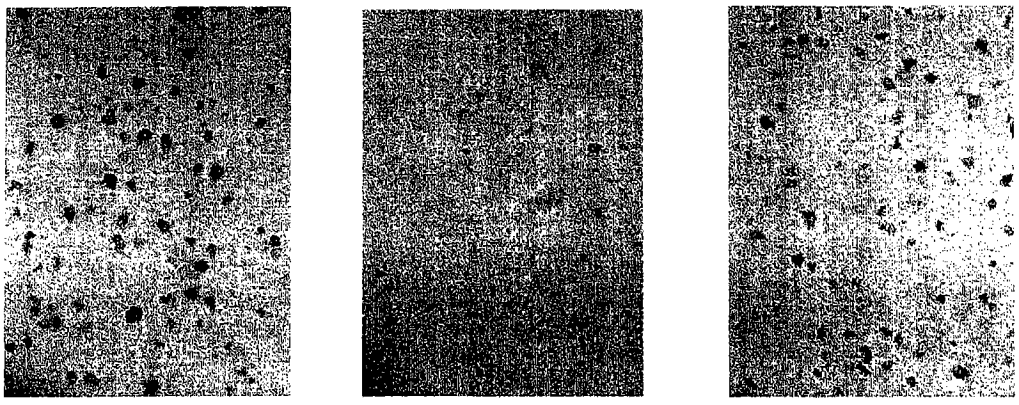

mIgG
GAL-F2
bFM-1

图 6

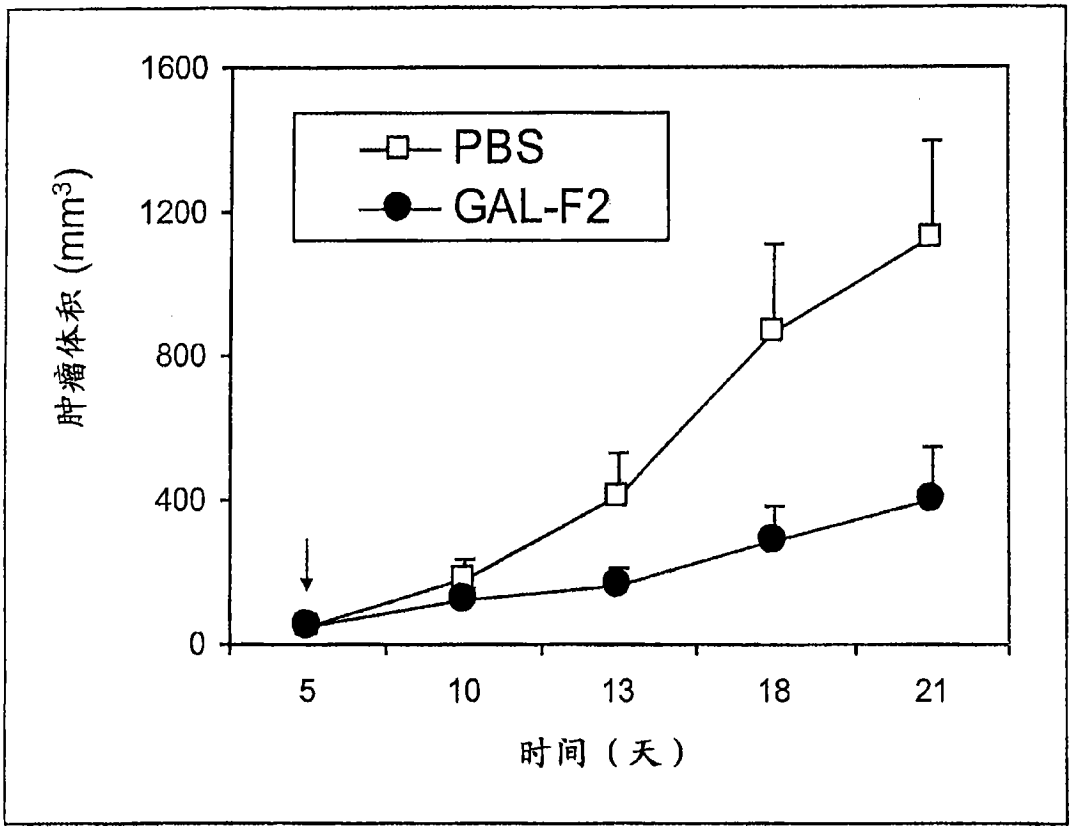

1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 (mm3)
PBS
GAL-F2
5
10
13
18
21
时间（天）

图 7

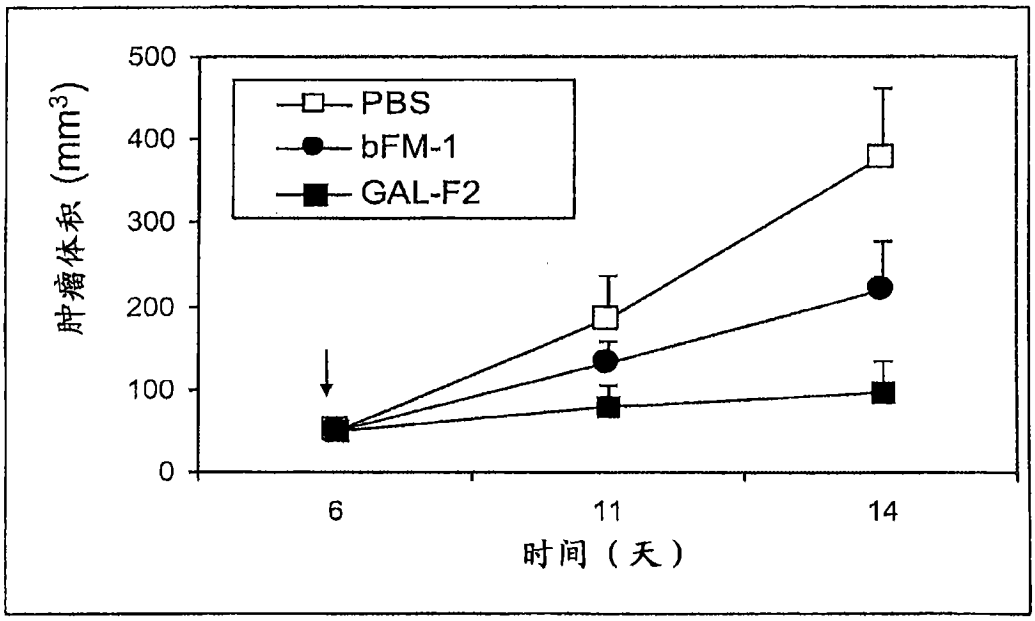

500
400
300
200
100
0
肿瘤体积 (mm3)
PBS
bFM-1
GAL-F2
6
11
14
时间（天）

图 8

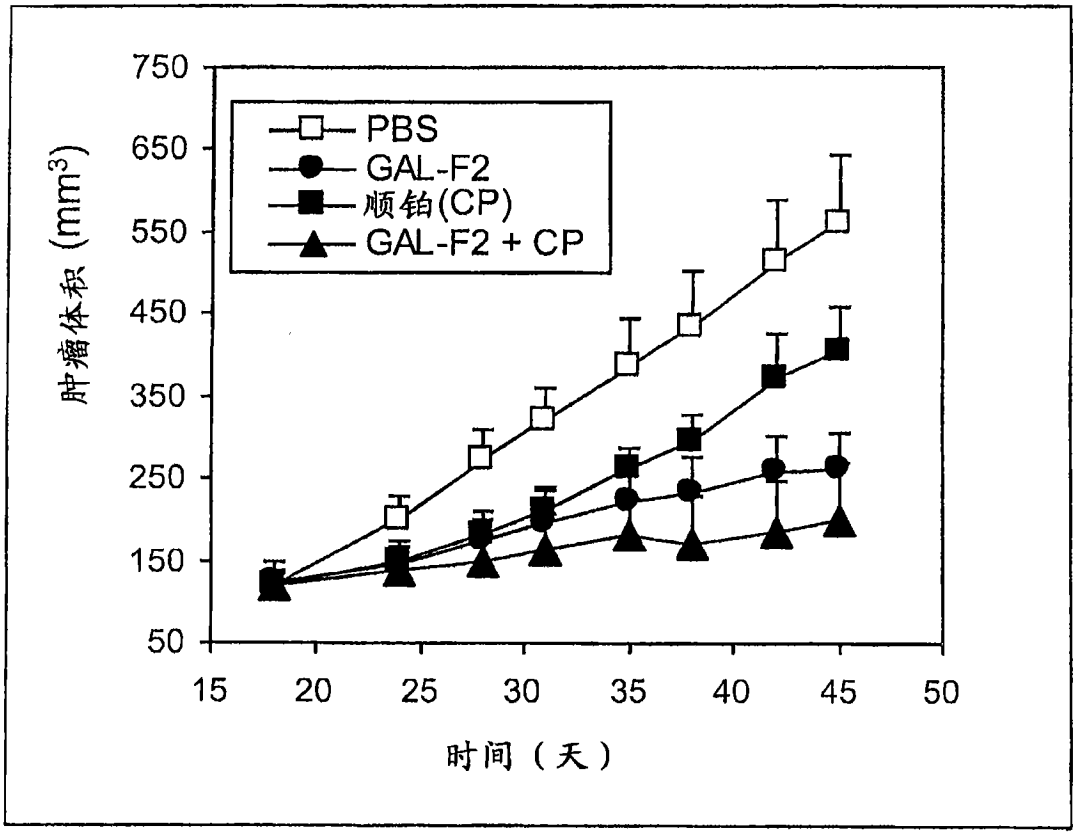

750
650
550
450
350
250
150
50
15
20
25
30
35
40
45
50
肿瘤体积 (mm3)
时间（天）
PBS
GAL-F2
顺铂(CP)
GAL-F2 + CP

图 9

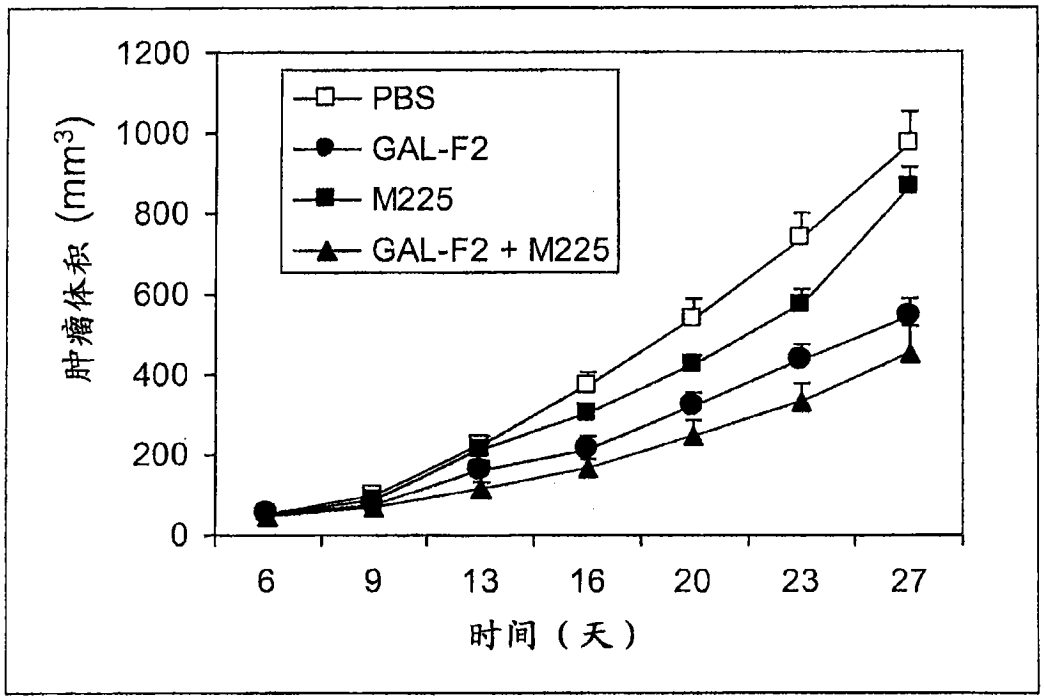

1200
1000
800
600
400
200
0
6
9
13
16
20
23
27
肿瘤体积 (mm3)
时间（天）
PBS
GAL-F2
M225
GAL-F2 + M225

图 10

A

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

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

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

B

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

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

            abc       9         10ab cd         11
          1222234567890 123456789000 00 1234567890123
GAL-F2    ELSSLTSEDSAVY YCAKEGGGKYVY AM DSWGQGTSVTVSS
HuGAL-F2  ELSSLRSEDTAVY YCAKEGGGKYVY AM DSWGQGTTVTVSS
AAL04519  ELSSLRSEDTAVY YCARvgqlgyyyygm dvWGQGTTVTVSS
```

图 11

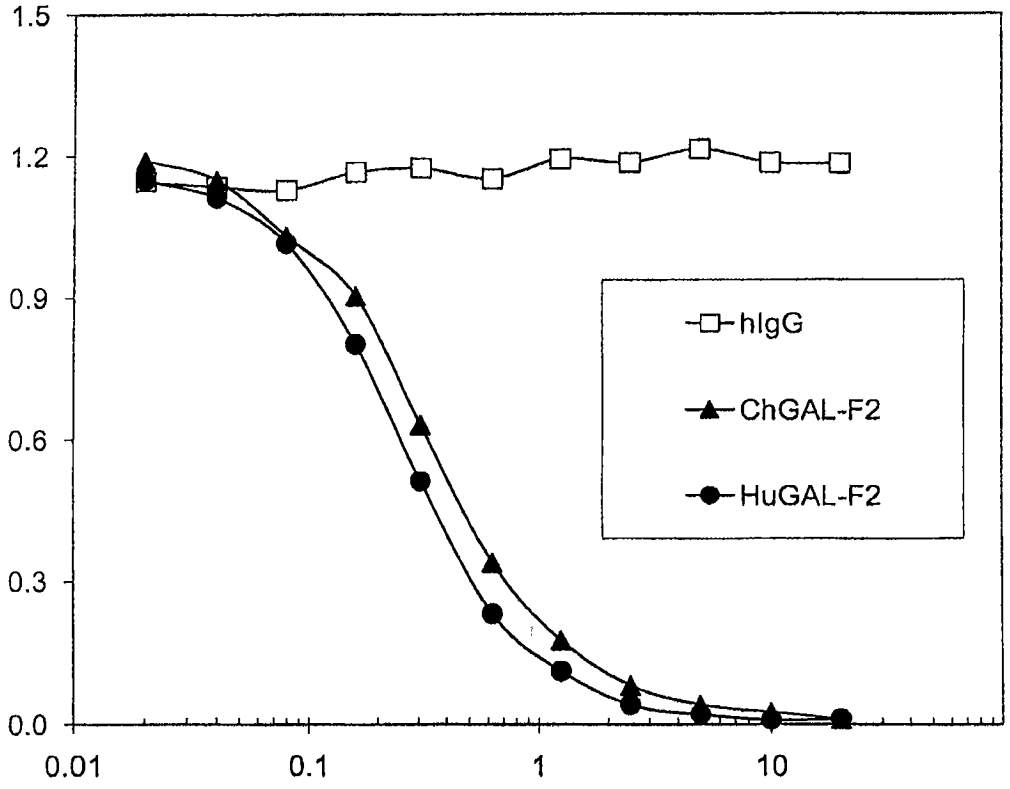


图 12

A

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

B

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

图 13