



0707

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

DVN
NOV

INVENTARIO
INDUSTRIA Y COMERCIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-129828

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES DE CEREBRO CON ANTICUERPOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

GALAXY BIOTECH, LLC, KENNEDY KRIEGER INSTITUTE INC.
y JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

DOMICILIO

1. CALIFORNIA ESTADOS UNIDOS, 2. MARYLAND, ESTADOS UNIDOS y
3. MARYLAND ESTADOS DE AMERICA

74. APODERADO

DILIA RODRIGUEZ D ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C.,

DIC. 7, 2007



No. 07-129828- -00000-0000

Fecha: 2007-12-07 15:56:40 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

ene/2/2008

1) SOLICITUD DE:



Patente de invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

2)
SOLICITANTE
(71)

Nombre: 1. GALAXY BIOTECH, LLC
2. KENNEDY KRIEGER INSTITUTE, INC.
3. JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

Dirección: 1. 22830 San Juan Road,
Cupertino, California 95014 Estados
Unidos
2. 707 North Broadway, Baltimore,
Maryland 21205 Estados Unidos
3. 3400 North Charles Street, Baltimore,
Maryland 21218 Estados Unidos

Nacionalidad o domicilio: 1. California,
Estados Unidos
2. Maryland, Estados Unidos
3. Maryland, Estados Unidos

Lugar de constitución: 1. California,
Estados Unidos
2. Maryland, Estados Unidos
3. Maryland, Estados Unidos

Teléfono: Fax:
E. Mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT: ☐

C.E. ☐

OTRO ☐

NÚMERO Cual

3)
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6
Bogotá D.C.

Teléfono: 6181088 Fax: 6350824
E. Mail: info@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT: ☐

C.E. ☐

OTRO ☐

NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4)
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1. KIM, Kyung Jin; 2. LATERRA, John; 3. LAL, Bachchu
Dirección: 1. 22830 San Juan Road, Cupertino California 95014
Estados Unidos; 2. 5401 St. Albans Way, Baltimore, Maryland 21212
Estados Unidos; 3. 1315 Sudvale Road, Pikesville, Maryland 21208
Estados Unidos
Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Estadounidenses

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/021293 Fecha: Junio 1, 2006

Publicación Internacional No. WO2006/130773 A2 Fecha: Dic. 7, 2006

6) Título (54) MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES DE CEREBRO
CON ANTICUERPOS

7) Clasificación Internacional: A61K 39/395

8) PRIORIDAD

33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de
Solicitud

SI ☒

NO ☐

Estados Unidos

Junio 2, 2005

60/687,118

Estados Unidos

Dic. 15, 2005

60/751,092

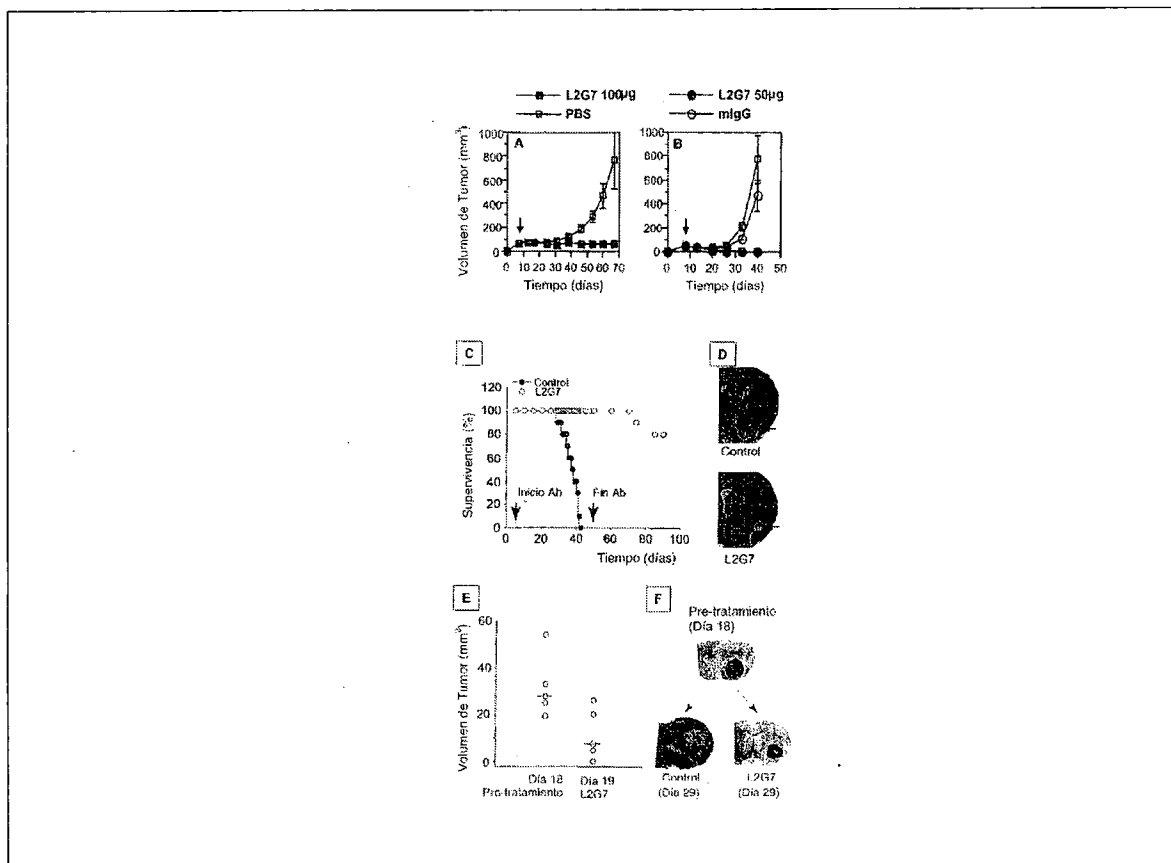
9) Comprobante de pago N°. 07-98,460 de Dic. 3, 2007

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
☐ Poderes, si fuera el caso
☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
☐ Declaraciones
☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
☒ Otros:
 1. IB-304

11) FIGURA CARACTERISTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

G.

p-10300h

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 98,460
FECHA : DICIEMBRE 3 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-129828- -00000-0000

Fecha: 2007-12-07 15:56:40 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64177535	03/12/2007	22,680,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRANMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

MON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P. 1030

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 December 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/130773 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

HOPKINS UNIVERSITY [US/US]; 3400 North Charles
Street, Baltimore, Maryland 21218 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2006/021293

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KIM, Kyung Jin
[US/US]; 22830 San Juan Road, Cupertino, California
95014 (US). LATERRA, John [US/US]; 5401 St. Albans
Way, Baltimore, Maryland 21212 (US). LAL, Bachchu
[IN/US]; 1315 Sudvale Road, Pikesville, Maryland 21208
(US).

(22) International Filing Date: 1 June 2006 (01.06.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(74) Agents: LIEBESCHUETZ, Joe et al.; TOWNSEND
AND TOWNSEND AND CREW LLP, Two Embarcadero
Center, 8th Floor, San Francisco, California 94111-3834
(US).

(30) Priority Data:
60/687,118 2 June 2005 (02.06.2005) US
60/751,092 15 December 2005 (15.12.2005) US

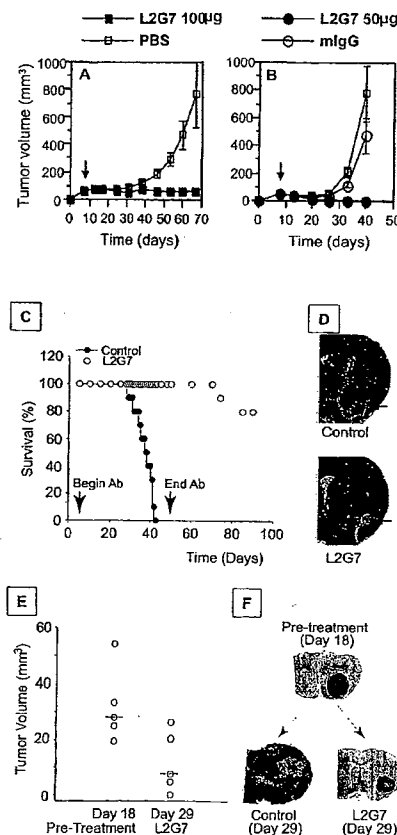
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,

(71) Applicants (for all designated States except US):
GALAXY BIOTECH, LLC [US/US]; 22830 San Juan
Road, Cupertino, California 95014 (US). KENNEDY
KRIEGER INSTITUTE, INC. [US/US]; 707 North
Broadway, Baltimore, Maryland 21205 (US). JOHNS

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF TREATING BRAIN TUMORS WITH ANTIBODIES

(57) Abstract: The application is directed toward a method of treating a
brain tumor in a patient comprising systemically administering a monoclonal
antibody.



WO 2006/130773 A2



NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

METHODS OF TREATING BRAIN TUMORS WITH ANTIBODIES

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] The present application is a nonprovisional and claims the benefit of 60/687118, filed 6/02/2005 and 60/751092 filed 12/15/2005, both incorporated by reference in their entirety for all purposes.

STATEMENT OF GOVERNMENT INTEREST

[0002] The work described in this application was funded in part by Grants 1R43CA101283-01A1 and RO1 NS32148 from the National Institutes of Health. The US government may have certain rights in this invention.

FIELD OF THE INVENTION

[0003] The present invention relates generally to treatment of brain tumors with antibodies and more particularly, for example, to treatment of brain tumors with monoclonal antibodies that bind to and neutralize Hepatocyte Growth Factor.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) is a multifunctional heterodimeric polypeptide produced by mesenchymal cells. HGF has been shown to stimulate angiogenesis, morphogenesis and motogenesis, as well as the growth and scattering of various cell types (Bussolino et al., J. Cell. Biol. 119: 629, 1992; Zarnegar and Michalopoulos, J. Cell. Biol. 129:1177, 1995; Matsumoto et al., Ciba. Found. Symp. 212:198, 1997; Birchmeier and Gherardi, Trends Cell. Biol. 8:404, 1998; Xin et al. Am. J. Pathol. 158:1111, 2001). The pleiotropic activities of HGF are mediated through its receptor, a transmembrane tyrosine kinase encoded by the proto-oncogene cMet. In addition to regulating a variety of normal cellular functions, HGF and its receptor c-Met have been shown to be involved in the initiation, invasion and metastasis of tumors (Jeffers et al., J. Mol. Med. 74:505, 1996; Comoglio and Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). HGF/cMet are coexpressed, often over-expressed, on various human solid tumors including tumors derived from lung, colon, rectum, stomach, kidney, ovary, skin, multiple myeloma and thyroid tissue (Prat et al., Int. J. Cancer 49:323, 1991; Chan et al., Oncogene 2:593, 1988; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993; Derksen et al., Blood 99:1405, 2002). HGF acts as an autocrine

(Rong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4731, 1994; Koochekpour et al., Cancer Res. 57:5391, 1997) and paracrine growth factor (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993) and anti-apoptotic regulator (Gao et al., J. Biol. Chem. 276:47257, 2001) for these tumors. Thus, antagonistic molecules, for example antibodies, blocking the HGF-cMet pathway potentially have wide anti-cancer therapeutic potential.

[0005] HGF is a 102 kDa protein with sequence and structural similarity to plasminogen and other enzymes of blood coagulation (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993, each of which is incorporated herein by reference). Human HGF is synthesized as a 728 amino acid precursor (proHGF), which undergoes intracellular cleavage to an inactive, single chain form (proHGF) (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Rosen et al., J. Cell. Biol. 127:1783, 1994). Upon extracellular secretion, proHGF is cleaved to yield the biologically active disulfide-linked heterodimeric molecule composed of an α -subunit and β -subunit (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Naldini et al., EMBO J. 11:4825, 1992). The α -subunit contains 440 residues (69 kDa with glycosylation), consisting of the N-terminal hairpin domain and four kringle domains. The β -subunit contains 234 residues (34 kDa) and has a serine protease-like domain, which lacks proteolytic activity. Cleavage of HGF is required for receptor activation, but not for receptor binding (Hartmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11574, 1992; Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1992). HGF contains 4 putative N-glycosylation sites, 1 in the α -subunit and 3 in the β -subunit. HGF has 2 unique cell specific binding sites: a high affinity ($K_d = 2 \times 10^{-10}$ M) binding site for the cMet receptor and a low affinity ($K_d = 10^{-9}$ M) binding site for heparin sulfate proteoglycans (HSPG), which are present on the cell surface and extracellular matrix (Naldini et al., Oncogene 6:501, 1991; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Sakata et al., J. Biol. Chem., 272:9457, 1997). NK2 (a protein encompassing the N-terminus and first two kringle domains of the α -subunit) is sufficient for binding to cMet and activation of the signal cascade for motility, however the full length protein is required for the mitogenic response (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993). HSPG binds to HGF by interacting with the N terminus of HGF (Aoyama, et al., Biochem. 36:10286, 1997; Sakata, et al., J. Biol. Chem. 272:9457, 1997). Postulated roles for the HSPG-HGF interaction include the enhancement of HGF bioavailability, biological activity and oligomerization (Bardelli, et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Zioncheck et al., J. Biol. Chem. 270:16871, 1995).

[0006] cMet is a member of the class IV protein tyrosine kinase receptor family. The full length cMet gene was cloned and identified as the cMet proto-oncogene (Cooper et al., Nature 311:29, 1984; Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987). The cMet receptor is initially synthesized as a single chain, partially glycosylated precursor, p170(MET) (Fig. 1) (Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987; Giordano et al., Nature 339:155, 1989; Giordano et al., Oncogene 4:1383, 1989; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994). Upon further glycosylation, the protein is proteolytically cleaved into a heterodimeric 190 kDa mature protein (1385 amino acids), consisting of the 50 kDa α -subunit (residues 1-307) and the 145 kDa β -subunit. The cytoplasmic tyrosine kinase domain of the β -subunit is involved in signal transduction.

[0007] Several different approaches have been investigated to attempt to obtain an effective antagonistic molecule of HGF/cMET: truncated HGF proteins such as NK1 (N terminal domain plus kringle domain 1; Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1993), NK2 (N terminal domain plus kringle domains 1 and 2; Chan et al., Science 254:1382, 1991) and NK4 (N-terminal domain plus four kringle domains; Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000) and anti-cMet mAbs (Dodge, Master's Thesis, San Francisco State University, 1998).

[0008] Most recently, Cao et al. (Proc. Natl Acad. Sci. USA. 98: 7443, 2001, which is incorporated herein by reference) reported that administration of a combination of 3 mAbs to HGF inhibited growth of subcutaneous glioma xenografts in mice. WO 2005/017107 A2, which is herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, reported that treatment with a single anti-HGF mAb could inhibit growth of subcutaneous glioma xenografts in mice. However, these publications did not address the question of whether systemic administration of an anti-HGF or other mAb can inhibit growth of a tumor in the brain, where the blood-brain barrier presents obstacles (Rich et al., Nat. Rev. Drug Discov. 3: 430, 2004). Indeed, previously observed inefficacy of systemic antibody therapies against central nervous system (CNS) tumors has been attributed to restricted vascular permeability even for CNS metastases (Bendell et al., Cancer 97: 2972, 2003).

[0009] Thus, there is a need for a method to treat brain tumors by systemic administration of a mAb. The present invention fulfills this and other needs.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] In one embodiment, the invention provides a method of treating a brain tumor in a patient by systemic administration of a mAb. The brain tumor may be a glioma such as an astrocytoma, e.g., a glioblastoma. Administration may be, for example, by intravenous, intramuscular or subcutaneous routes. In a preferred embodiment, the mAb is a neutralizing mAb to Hepatocyte Growth Factor (HGF) such as a humanized L2G7 mAb. In another preferred embodiment, systemic administration of a mAb such as a neutralizing anti-HGF mAb is used to induce regression of a brain tumor.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0011] Figure 1. Binding and blocking activities of anti-HGF mAbs measured by ELISA. A. For binding, mAbs were captured onto a goat anti-mouse IgG coated ELISA plate, blocked with BSA and incubated with HGF-Flag (1 μ g/ml), followed by HRP-M2 anti-Flag mAb (Invitrogen). B. For blocking of HGF-Flag to Met-Fc binding, plates were coated with goat anti-human IgG-Fc, blocked with BSA, incubated with Met-Fc (2 μ g/ml), and then with HGF-Flag (1 μ g/ml) +/- anti-HGF mAbs. The bound HGF-Flag bound was detected with HRP-M2 anti-Flag mAb.

[0012] Figure 2. Blocking effects of mAb L2G7 on the scattering, mitogenic, angiogenic, and anti-apoptotic activities of HGF. A. MDCK cells (ATCC) were stimulated with 50 ng/ml of HGF +/- 10 μ g/ml L2G7 for 2 days as described (Cao et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 98: 7443, 2001). Photographs were taken at 100x magnification after the cells were stained with crystal violet. B. Mv 1 Lu mink lung epithelial cells (ATCC; 5 x 10⁴ cells/ml) were incubated in serum free DMEM with or without HGF (50 ng/ml) and L2G7 or isotype-matched control mAb (mIgG) for 24 hr, and the level of cell proliferation determined by addition of 3H-thymidine for 6 hr. C. As described (Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001), HUVEC (CAMBREX; 104 cells/100 μ l/well) were incubated in EBM-2/0.1% FCS with or without HGF (50 ng/ml) and L2G7 or control mAb for 72 hr and the level of proliferation determined by the addition of WST-1. D. As described (Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001), HUVEC (6 x 10⁴ cells/100 μ l/well) in DMEM/gel were overlaid with 100 μ l/well of EMB-2/0.1% FCS/0.1% BSA with or without 200 ng/ml of HGF +/- 20 μ g/ml of L2G7. After 48 hr incubation, cells were fixed and stained using toluidine blue and photographs taken at 40x magnification. E. As described (Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005), U87 tumor cells in serum free DMEM were treated with or without HGF (20 ng/ml) +/- mAb L2G7 (20 μ g/ml) or isotype control antibody (mIgG) for 48 hr and then with anti-

Fas mAb CH-11 (Upstate Biotechnology, 40 ng/ml) for 24 hr, and cell viability determined by the addition of WST-1. In b, c and e, values are mean $\pm$ s.d.

[0013] Figure 3. Inhibition or regression of glioma tumor xenografts by L2G7. U118 (A) or U87 (B) glioma tumor cells were implanted subcutaneously into NIH III Beige/Nude mice and tumor size monitored as described (Kim et al., Nature 362: 841, 1993). After tumor size had reached ~ 50 mm³, groups of mice (n = 6 or 7) were treated twice weekly i.p. with 50 or 100 μ g L2G7 or 100 μ g isotype-matched control mAb (mIgG) or PBS as indicated; arrows show first day of treatment. Values are mean tumor volume $\pm$ s.e.m. C. U87 tumor cells (105 per mouse) were injected intracranially into the caudate/ putamen of Scid/beige mice as described (Abounader et al. FASEB J. 16, 108, 2002). Starting and ending respectively on day 5 and day 52 as indicated by arrows, groups of mice (n = 10) were administered i.p. 100 μ g L2G7 or PBS twice weekly and survival monitored. Survival studies were analyzed by Kaplan-Meier plots. D. Brain sections prepared as described (Abounader et al. FASEB J. 16, 108, 2002) from representative mice sacrificed on day 21 after 3 doses of twice weekly i.p. treatment with 100 μ g L2G7 or PBS, showing size of U87 intracranial xenografts. E. Intracranial U87 tumor volumes in individual mice on Day 18 before starting treatment and on Day 29 after treatment 3 times with L2G7. F. Brain sections from representative mice on Day 18 before treatment and on Day 29 after treatment with L2G7 or control mAb.

[0014] Figure 4. Histological analysis of brain sections from mice with U87 intracranial xenografts. The mice were sacrificed after treatment of pre-established tumors with three twice-weekly doses of L2G7 or control. Perfusion-fixed cryostat sections were stained with H&E and the indicated antibody and indexes quantified using computer-assisted image analysis. A. Anti-Ki67 (DAKO) to detect proliferating cells. B. Anti-laminin (Life Technologies) to detect blood vessels. C. Antibody to cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology) to detect apoptotic tumor cell responses.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0015] The invention provides a method of treating brain tumors by systemic administration of a neutralizing mAb to HGF or antibodies against other cytokines such as growth factors or against cell surface proteins such as cytokine receptors. Although an understanding of mechanism is not required for practice of the invention, it is believed that the success of the invention resides at least in part due to passage of antibody from the blood into brain tumors due to a defective blood brain barrier within the tumors.

1. Antibodies

[0016] Antibodies are very large, complex molecules (molecular weight of ~150,000 or about 1320 amino acids) with intricate internal structure. A natural antibody molecule contains two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one light chain and one heavy chain. Each light chain and heavy chain in turn consists of two regions: a variable ("V") region involved in binding the target antigen, and a constant ("C") region that interacts with other components of the immune system. The light and heavy chain variable regions fold up together in 3-dimensional space to form a variable region that binds the antigen (for example, a receptor on the surface of a cell). Within each light or heavy chain variable region, there are three short segments (averaging 10 amino acids in length) called the complementarity determining regions ("CDRs"). The six CDRs in an antibody variable domain (three from the light chain and three from the heavy chain) fold up together in 3-D space to form the actual antibody binding site which locks onto the target antigen. The position and length of the CDRs have been precisely defined. Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987. The part of a variable region not contained in the CDRs is called the framework, which forms the environment for the CDRs.

[0017] A monoclonal antibody (mAb) is a single molecular species of antibody and therefore does not encompass polyclonal antibodies produced by injecting an animal (such as a rodent, rabbit or goat) with an antigen, and extracting serum from the animal. A humanized antibody is a genetically engineered (monoclonal) antibody in which the CDRs from a mouse antibody ("donor antibody", which can also be rat, hamster or other similar species) are grafted onto a human antibody ("acceptor antibody"). Humanized antibodies can also be made with less than the complete CDRs from a mouse antibody (e.g., Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). Thus, a humanized antibody is an antibody having CDRs from a donor antibody and variable region framework and constant regions from a human antibody. In addition, in order to retain high binding affinity, at least one of two additional structural elements can be employed. See, US Patent No. 5,530,101 and 5,585,089, each of which is incorporated herein by reference, which provide detailed instructions for construction of humanized antibodies.

[0018] In the first structural element, the framework of the heavy chain variable region of the humanized antibody is chosen to have maximal sequence identity (between 65% and

95%) with the framework of the heavy chain variable region of the donor antibody, by suitably selecting the acceptor antibody from among the many known human antibodies. In the second structural element, in constructing the humanized antibody, selected amino acids in the framework of the human acceptor antibody (outside the CDRs) are replaced with corresponding amino acids from the donor antibody, in accordance with specified rules. Specifically, the amino acids to be replaced in the framework are chosen on the basis of their ability to interact with the CDRs. For example, the replaced amino acids can be adjacent to a CDR in the donor antibody sequence or within 4-6 angstroms of a CDR in the humanized antibody as measured in 3-dimensional space.

[0019] A chimeric antibody is an antibody in which the variable region of a mouse (or other rodent) antibody is combined with the constant region of a human antibody; their construction by means of genetic engineering is well-known. Such antibodies retain the binding specificity of the mouse antibody, while being about two-thirds human. The proportion of nonhuman sequence present in mouse, chimeric and humanized antibodies suggests that the immunogenicity of chimeric antibodies is intermediate between mouse and humanized antibodies. Other types of genetically engineered antibodies that may have reduced immunogenicity relative to mouse antibodies include human antibodies made using phage display methods (Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; and Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998, each of which is incorporated herein by reference) or using transgenic animals (Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741, each of which is incorporated herein by reference).

[0020] As used herein, the term "human-like" antibody refers to a mAb in which a substantial portion of the amino acid sequence of one or both chains (e.g., about 50% or more) originates from human immunoglobulin genes. Hence, human-like antibodies encompass but are not limited to chimeric, humanized and human antibodies. As used herein, a "reduced-immunogenicity" antibody is one expected to have significantly less immunogenicity than a mouse antibody when administered to human patients. Such antibodies encompass chimeric, humanized and human antibodies as well as antibodies made by replacing specific amino acids in mouse antibodies that may contribute to B- or T-cell epitopes, for example exposed residues (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). As used herein, a "genetically engineered" antibody is one for which the genes have been constructed or put in an unnatural environment (e.g., human genes in a mouse or on a bacteriophage) with

the help of recombinant DNA techniques, and would therefore, e.g., not encompass a mouse mAb made with conventional hybridoma technology.

[0021] The epitope of a mAb is the region of its antigen to which the mAb binds. Two antibodies bind to the same or overlapping epitope if each competitively inhibits (blocks) binding of the other to the antigen. That is, a 1x, 5x, 10x, 20x or 100x excess of one antibody inhibits binding of the other by at least 50% but preferably 75%, 90% or even 99% as measured in a competitive binding assay (see, e.g., Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990, which is incorporated herein by reference). Alternatively, two antibodies have the same epitope if essentially all amino acid mutations in the antigen that reduce or eliminate binding of one antibody reduce or eliminate binding of the other. Two antibodies have overlapping epitopes if some amino acid mutations that reduce or eliminate binding of one antibody reduce or eliminate binding of the other.

2. Neutralizing anti-HGF Antibodies

[0022] A monoclonal antibody (mAb) that binds HGF (i.e., an anti-HGF mAb) is said to neutralize HGF, or be neutralizing, if the binding partially or completely inhibits one or more biological activities of HGF (i.e., when the mAb is used as a single agent). Among the biological properties of HGF that a neutralizing antibody may inhibit are the ability of HGF to bind to its cMet receptor, to cause the scattering of certain cell lines such as Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells; to stimulate proliferation of (i.e., be mitogenic for) certain cells including hepatocytes, 4MBr-5 monkey epithelial cells, and various human tumor cells; or to stimulate angiogenesis, for example as measured by stimulation of human vascular endothelial cell (HUVEC) proliferation or tube formation or by induction of blood vessels when applied to the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). Antibodies used in the invention preferably bind to human HGF, i.e., to the protein encoded by the GenBank sequence with Accession number D90334. Similarly, a neutralizing, i.e., antagonist antibody against any cytokine or cytokine receptor may inhibit binding of the cytokine to the receptor and/or inhibit transmission of a signal to the cell by the cytokine. If the cytokine is a growth factor, such an antibody may inhibit proliferation of cells induced by the cytokine.

[0023] A neutralizing mAb used in the invention typically inhibits at a concentration of, e.g., 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 or 50 $\mu\text{g/ml}$ a biological function of a cytokine, e.g., HGF (for example., stimulation of proliferation or angiogenesis) by about at least 50% but preferably 75%, more preferably by 90% or 95% or even 99%, and most preferably

approximately 100% (essentially completely) as assayed by methods described under Examples or known in the art. Typically, the extent of inhibition is measured when the amount of cytokine used is just sufficient to fully stimulate the biological activity, or is 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3 or 10 $\mu\text{g/ml}$. Preferably, at least 50%, 75%, 90%, or 95% or essentially complete inhibition is achieved when the molar ratio of antibody to cytokine is 0.5x, 1x, 2x, 3x, 5x or 10x. Preferably, the mAb is neutralizing, i.e., inhibit the biological activity, when used as a single agent, but in some methods, two mAbs are used together to give inhibition. Most preferably, the mAb neutralizes not just one but several of the biological activities listed above; for purposes herein, an anti-HGF mAb that used as a single agent neutralizes all the biological activities of HGF is called "fully neutralizing", and such mAbs are most preferable. MAbs used in the invention are preferably be specific for HGF, that is they do not bind, or only bind to a much lesser extent, proteins that are related to HGF such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). The mAbs typically have a binding affinity (K_a) of at least 10^7 M^{-1} but preferably 10^8 M^{-1} or higher, and most preferably 10^9 M^{-1} or higher or even 10^{10} M^{-1} or higher.

[0024] MAbs used in the invention include antibodies in their natural tetrameric form (2 light chains and 2 heavy chains) and may be of any of the known isotypes IgG, IgA, IgM, IgD and IgE and their subtypes, i.e., human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. The mAbs are also meant to include fragments of antibodies such as Fv, Fab and F(ab')₂; bifunctional hybrid antibodies (e.g., Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), single-chain antibodies (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); and antibodies with altered constant regions (e.g., U.S. Patent No. 5,624,821). The mAbs may be of animal (e.g., mouse, rat, hamster or chicken) origin, or they may be genetically engineered. Rodent mAbs are made by standard methods well-known in the art, comprising multiple immunization with HGF in appropriate adjuvant i.p., i.v., or into the footpad, followed by extraction of spleen or lymph node cells and fusion with a suitable immortalized cell line, and then selection for hybridomas that produce antibody binding to HGF, e.g., see under Examples. Chimeric and humanized mAbs, made by art-known methods mentioned supra, are used in preferred embodiments of the invention. Human antibodies made, e.g., by phage display or transgenic mice methods are also preferred (see e.g., Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, supra). More generally, human-like, reduced immunogenicity and genetically engineered antibodies as defined herein are all preferred.

[0025] The neutralizing anti-HGF mAb L2G7 (deposited at the American Type Culture Collection under ATCC Number PTA-5162 according to the Budapest treaty) is a preferred example of a Mab for use in the invention. The deposit will be maintained at an authorized depository and replaced in the event of mutation, nonviability or destruction for a period of at least five years after the most recent request for release of a sample was received by the depository, for a period of at least thirty years after the date of the deposit, or during the enforceable life of the related patent, whichever period is longest. All restrictions on the availability to the public of these cell lines will be irrevocably removed upon the issuance of a patent from the application. Neutralizing mAbs with the same or overlapping epitope as L2G7 provide other examples. Variants of L2G7 such as a chimeric or humanized form of L2G7 are especially preferred. A mAb that competes with L2G7 for binding to HGF and neutralizes HGF in in vitro or in vivo assays described herein is also preferred. Other variants of L2G7 such as mAbs that are 90%, 95% or 99% identical to L2G7 in variable region amino acid sequence (e.g., when aligned by the Kabat numbering system; Kabat et al., op. cit.), at least in the CDRs, and maintain its functional properties, or which differ from it by a small number of functionally inconsequential amino acid substitutions (e.g., conservative substitutions), deletions, or insertions may also be used in the invention. Other preferred mAbs include human-like, reduced-immunogenicity and genetically engineered mAbs as defined herein.

[0026] Any amino acid substitutions from exemplified immunoglobulins are preferably conservative amino acid substitutions. For purposes of classifying amino acids substitutions as conservative or nonconservative, amino acids may be grouped as follows: Group I (hydrophobic sidechains): met, ala, val, leu, ile; Group II (neutral hydrophilic side chains): cys, ser, thr; Group III (acidic side chains): asp, glu; Group IV (basic side chains): asn, gln, his, lys, arg; Group V (residues influencing chain orientation): gly, pro; and Group VI (aromatic side chains): trp, tyr, phe. Conservative substitutions involve substitutions between amino acids in the same class. Non-conservative substitutions constitute exchanging a member of one of these classes for a member of another.

[0027] Yet other mAbs preferred for use in the invention include all the anti-HGF mAbs described in US 2005/0019327 A1 or WO 2005/017107 A2, whether explicitly by name or sequence or implicitly by description or relation to explicitly described mAbs (both cited applications are herein incorporated by reference for their disclosure of antibodies and all other purposes). Especially preferred mAbs are those produced by the hybridomas

designated therein as 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 and 3.10.1 and respectively defined by their heavy and light chain variable region sequences provided by SEQ ID NO's 24-43 of WO2005/017107 A2; mAbs possessing the same respective CDRs as any of these listed mAbs; mAbs having light and heavy chain variable regions that are at least 90%, 95% or 99% identical to the respective variable regions of these listed mAbs or differing from them only by inconsequential amino acid substitutions, deletion or insertions; mAbs binding to the same epitope of HGF as any of these listed mAbs, and all mAbs encompassed by claims 1 through 94 therein. Sequence identities are determined between immunoglobulin variable region sequences aligned using the Kabat numbering convention.

[0028] In other embodiments, a mAb for use in the invention, i.e., for treatment of a brain tumor by systemic administration of the mAb, binds to one or more of the following growth factors: vascular endothelial cell growth factor (VEGF); a neurotrophin such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), or NT-3; a transforming growth factor such as TGF- α or TGF- β (TGF- β 1 and/or TGF- β 2); platelet-derived growth factor (PDGF); epidermal growth factor (EGF); heregulin; epiregulin; amphiregulin; a neuregulin (NRG-1 α and/or NRG-1 β , NRG-2 α and/or NRG-2 β , NRG-3, or NRG-4), insulin-like growth factor (IGF-1 and IGF-2); or in a preferred embodiment a fibroblast growth factor (FGF) especially acidic FGF (FGF-1) or most preferably basic FGF (FGF-2), but alternatively FGF-n, where n is any number from 3 to 23. In general, such a mAb is neutralizing. In still other embodiments, the mAb for use in the invention binds to a cellular receptor for any one or more of the above-mentioned growth factors.

[0029] Native mAbs for use in the invention may be produced from their hybridomas. Genetically engineered mAbs, e.g., chimeric or humanized mAbs, may be expressed by a variety of art-known methods. For example, genes encoding their light and heavy chain V regions may be synthesized from overlapping oligonucleotides and inserted together with available C regions into expression vectors (e.g., commercially available from Invitrogen) that provide the necessary regulatory regions, e.g., promoters, enhancers, poly A sites, etc. Use of the CMV promoter-enhancer is preferred. The expression vectors may then be transfected using various well-known methods such as lipofection or electroporation into a variety of mammalian cell lines such as CHO or non-producing myelomas including Sp2/0 and NS0, and cells expressing the antibodies selected by appropriate antibiotic selection.

See, e.g., US Patent No. 5,530,101. Larger amounts of antibody may be produced by growing the cells in commercially available bioreactors.

[0030] Once expressed, the mAbs or other antibodies for use in the invention may be purified according to standard procedures of the art such as microfiltration, ultrafiltration, protein A or G affinity chromatography, size exclusion chromatography, anion exchange chromatography, cation exchange chromatography and/or other forms of affinity chromatography based on organic dyes or the like. Substantially pure antibodies of at least about 90 or 95% homogeneity are preferred, and 98% or 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses.

3. Therapeutic Methods

[0031] In a preferred embodiment, the present invention provides a method of treatment with a pharmaceutical formulation comprising a mAb described herein. Pharmaceutical formulations of the antibodies contain the mAb in a physiologically acceptable carrier, optionally with excipients or stabilizers, in the form of lyophilized or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, or acetate at a pH typically of 5.0 to 8.0, most often 6.0 to 7.0; salts such as sodium chloride, potassium chloride, etc. to make isotonic; antioxidants, preservatives, low molecular weight polypeptides, proteins, hydrophilic polymers such as polysorbate 80, amino acids, carbohydrates, chelating agents, sugars, and other standard ingredients known to those skilled in the art (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). The mAb is typically present at a concentration of 1 - 100 mg/ml, e.g., 10 mg/ml. The mAb can also be encapsulated into carrying agents such as liposomes.

[0032] In another preferred embodiment, the invention provides a method of treating a patient with a brain tumor by systemic administration of a mAb, such as a neutralizing anti-HGF mAb or an antibody against a cytokine or its receptor. The patient is preferably human but may be any mammal. By systemic administration, we mean herein a route of administration in which the mAb has general access to the circulatory system, and therefore to the organs of the body, including the blood vessels of the brain. In other words, the mAb is administered on the peripheral side of the blood brain barrier. Examples of systemic administration include intravenous infusion or bolus injection, or intramuscularly or subcutaneously or intraperitoneally. However, systemic administration does not encompass

injection directly into the tumor or into an organ such as the brain or its surrounding membranes or cerebrospinal fluid. Intravenous infusion can be given over as little as 15 minutes, but more often for 30 minutes, or over 1, 2, 3 or even 4 or more hours. The dose given is sufficient to cure, at least partially alleviate or inhibit further development of the condition being treated ("therapeutically effective dose"). A therapeutically effective dose preferably causes regression or more preferably elimination of the tumor. A therapeutically effective dosage is usually from 0.1 to 5 mg/kg body weight, for example 1, 2, 3 or 4 mg/kg, but may be as high as 10 mg/kg or even 15 or 20 mg/kg. A fixed unit dose may also be given, for example, 50, 100, 200, 500 or 1000 mg, or the dose may be based on the patient's surface area, e.g., 100 mg/m². A therapeutically effective dosage administered at a frequency sufficient to cure, at least partially alleviate or inhibit further development of the condition being treated is referred to as a therapeutically effective regime. Such a regime preferably causes regression or more preferably elimination of the tumor. Usually between 1 and 8 doses, (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) are administered to treat cancer, but 10, 20 or more doses may be given. The mAb can be administered daily, biweekly, weekly, every other week, monthly or at some other interval, depending, e.g. on the half-life of the mAb, for 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 8 weeks, 3-6 months or longer. Repeated courses of treatment are also possible, as is chronic administration.

[0033] The methods of this invention, e.g., systemic administration of a mAb such as anti-HGF mAb, especially L2G7 and its variants including humanized L2G7, can be used to treat all brain tumors including meningiomas; gliomas including ependymomas, oligodendrogliomas, and all types of astrocytomas (low grade, anaplastic, and glioblastoma multiforme or simply glioblastoma); medulloblastomas, gangliogliomas, schwannomas, chordomas; and brain tumors primarily of children including primitive neuroectodermal tumors. Both primary brain tumors (i.e., arising in the brain) and secondary or metastatic brain tumors can be treated by the methods of the invention. Brain tumors that express Met and/or HGF, especially at elevated levels, are particularly suitable for treatment by systemic administration of a neutralizing anti-HGF antibody such as L2G7 or its variants.

[0034] In a preferred embodiment, the mAb is administered together in combination with (i.e., before, during or after) other anti-cancer therapy. For example, the mAb, e.g., an anti-HGF mAb such as L2G7 and its variants, may be administered together with any one or more of the chemotherapeutic drugs known to those of skill in the art of oncology, for example alkylating agents such as carmustine, chlorambucil, cisplatin, carboplatin, oxiplatin,

procarbazine, and cyclophosphamide; antimetabolites such as fluorouracil, floxuridine, fludarabine, gemcitabine, methotrexate and hydroxyurea; natural products including plant alkaloids and antibiotics such as bleomycin, doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, etoposide, mitomycin, mitoxantrone, vinblastine, vincristine, and Taxol (paclitaxel) or related compounds such as Taxotere®; agents specifically approved for brain tumors including temozolomide and Gliadel® wafer containing carmustine; and other drugs including irinotecan and Gleevec® and all approved and experimental anti-cancer agents listed in WO 2005/017107 A2 (which is herein incorporated by reference). The mAb can be administered in combination with 1, 2, 3 or more of these agents, e.g., in a standard chemotherapeutic regimen. Other agents with which an anti-HGF mAb can be administered include biologics such as monoclonal antibodies, including Herceptin™ against the HER2 antigen, Avastin™ against VEGF, antibodies to the EGF receptor such as Erbitux®, or an anti-FGF mAb, as well as small molecule anti-angiogenic or EGF receptor antagonist drugs such as Iressa® and Tarceva®. In addition, the mAb can be administered together with any form of radiation therapy including external beam radiation, intensity modulated radiation therapy (IMRT) and any form of radiosurgery including Gamma Knife, Cyberknife, Linac, and interstitial radiation (e.g. implanted radioactive seeds, GliaSite balloon).

[0035] Although in a preferred embodiment of the invention, the mAb is not linked or conjugated to any other agent, in other embodiments the mAb may be conjugated to a radioisotope, chemotherapeutic drug or prodrug or a toxin. For example, it may be linked to a radioisotope that emits alpha, beta and/or gamma rays, e.g., ⁹⁰Y, isotopes of iodine such as ¹³¹I, or isotopes of bismuth such as ²¹²Bi or ²¹⁴Bi; to a plant or bacterial protein toxin such as ricin or pseudomonas exotoxin or their fragments such as PE40; to a small-molecule toxin such as compounds related to or derived from calicheamicin, auristatin or maytansine; or to a chemotherapeutic drug such as doxorubin or any of the others chemotherapeutic drugs listed above. Methods of linking such agents to a mAb are well-known to those skilled in the art.

[0036] Systemic administration of a mAb, e.g., a neutralizing anti-HGF mAb such as L2G7 or its variants, optionally plus other treatment (e.g., chemotherapy or radiation therapy), can increase the median progression-free survival or overall survival time of patients with certain brain tumors (e.g., glioblastomas) by at least 30% or 40% but preferably 50%, 60% to 70% or even 100% or longer, compared to a control regime without administration of the mAb. If administration of anti-HGF mAb is accompanied by other treatment such as chemotherapy or radiation, the other treatment is also included in the control regime. If anti-HGF mAb is

administered without other treatment, the control regime is a placebo or no specific treatment. In addition or alternatively, systemic administration of a mAb, e.g., a neutralizing anti-HGF mAb such as L2G7 or its variants, plus other treatment (e.g., chemotherapy or radiation therapy), may increase the complete response rate (complete regression of the tumor, i.e., remission), partial response rate (a partial response in a patient means partial shrinkage of the tumor size, e.g., by at least 30% or 50%), or objective response rate (complete + partial) of patients with certain brain tumors by at least 30% or 40% of the patients but preferably 50%, 60% to 70% or even 90% or more compared to a control regime without administration of the mAb as described above. Changes in the size of a tumor responsive to treatment can be determined by MRI, CT scanning and the like.

[0037] Similarly, when systemically administered to animals (e.g., immunodeficient mice such as nude mice or SCID mice) bearing intracranial xenografts of human glioma tumors, e.g., as described in Example 2 below, the neutralizing anti-HGF mAb or anti-FGF mAb or other mAb will prolong median survival of the animals by at least about 25 or 30 or 40 days, but preferably 50, 60, or 70 days or even longer, and such an extension will be statistically significant. This will be true even when initiation of treatment is delayed until at least 5 or 18 days or longer after tumor cell implantation. Moreover, such treatment will on average shrink the tumors by at least 25% but preferably 50% or even 75%; and the average tumor volume in animals treated with the mAb will be less than 50% or even 25% or 10% of the average tumor volume in control-treated animals. The tumor size will typically be measured 21 or 29 days after tumor cell implantation.

[0038] Typically, in a clinical trial (e.g., a phase II, phase II/III or phase III trial), the aforementioned increases in median progression-free survival and/or response rate of the patients treated by administration of a mAb, e.g., an anti-HGF mAb, optionally plus other treatment relative to the patients receiving a control regime without the antibody, are statistically significant, for example at the $p = 0.05$ or 0.01 or even 0.001 level. The complete and partial response rates are determined by objective criteria commonly used in clinical trials for cancer, e.g., as listed or accepted by the National Cancer Institute and/or Food and Drug Administration.

EXAMPLES

1. Generation and in vitro properties of anti-HGF mAbs

[0039] The development of a fully neutralizing anti-HGF mAb L2G7 has been described in U.S. Patent Application Pub. No. US 2005/0019327 A1, which is herein incorporated by reference. In summary, Balb/c mice were extensively immunized with recombinant human HGF by footpad injections, and hybridomas were generated from them by conventional means. Chimeric fusion proteins consisting of HGF fused to Flag peptide (HGF-Flag), and the Met extracellular domain fused to the human IgG1 Fc region (Met-Fc), were produced by conventional recombinant techniques and used to determine the ability of the anti-HGF mAbs to inhibit the binding of HGF to its Met receptor. Fig. 1a demonstrates the ability of three separate anti-HGF mAbs, each recognizing a different epitope to capture HGF in solution. Although the IgG2a mAb L2G7 has intermediate affinity for HGF as judged by binding ability, it is the only mAb identified that completely blocks binding of HGF-Flag to Met-Fc in an ELISA (Fig. 1b). The mAb L2G7 is specific for HGF, as it shows no binding to other growth factors such as VEGF, FGF or EGF.

[0040] The ability of mAb L2G7 to block HGF binding to Met suggested that it would inhibit all HGF-induced cell responses, but this supposition required verification because the α and β -subunits of HGF mediate different activities (Lokker et al., EMBO J. 11: 2503, 1992; Hartmann et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 89: 11574, 1992). One important bioactivity of HGF mediated through its α -subunit, from which its alternate name "scatter factor" derives, is the ability to induce cell scattering. Fig. 2a shows that L2G7 is able to completely inhibit HGF-induced scattering of MDCK epithelial cells, a widely used biological assay for quantifying HGF scatter activity. A key biological activity of HGF mediated through its β subunit is mitogenesis of certain cell types. Fig. 2b shows that L2G7 at a 1:1 molar ratio of mAb to HGF completely inhibits HGF-induced 3H-thymidine incorporation in Mv 1 Lu mink lung epithelial cells. Thus, mAb L2G7 blocks HGF-induced biological activities attributable to both the α - and β - HGF subunits.

[0041] Angiogenesis is required for growth of solid tumors. HGF is a potent angiogenic factor (Grant et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 90: 1937, 1993) and tumor levels of HGF correlate with the vascular density of human malignancies including gliomas (Schmidt. et al. Int. J. Cancer 84: 10, 1999). HGF can also stimulate the production of other angiogenic factors such as VEGF and can potentiate VEGF-induced angiogenesis (Xin et al. Am. J.

Pathol. 158, 1111, 2001). Two early steps involved in angiogenesis are endothelial cell proliferation and tubule formation. The effect of L2G7 on HGF-induced proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and formation of vessel-like tubules in 3 dimensional collagen gels was therefore determined. Stimulation of HUVEC proliferation by HGF (50 ng/ml, 72 hr) was completely inhibited by L2G7 at a 1.5:1 mAb to HGF molar ratio (Fig. 2c). HUVECs suspended in 3-D collagen gels developed an interconnected branching tubule network after stimulation with HGF (200 ng/ml, 48 hr), while cells treated with HGF plus L2G7 showed little or no such tubule formation (Fig. 2d). Hence L2G7 blocks HGF-induced proliferative and morphogenic aspects of angiogenesis.

[0042] HGF protects tumor cells from apoptotic death induced by numerous modalities including DNA-damaging agents commonly used in cancer therapy (Bowers et al. Cancer Res. 60: 4277, 2000; Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005). The majority of human malignant glioma cells express the death receptor FAS, making them susceptible to apoptosis induced by anti-FAS antibody in vitro (Weller et al. J. Clin. Invest. 94: 954, 1994). Thus, the effects of L2G7 on HGF-mediated cytoprotection of U87 glioma cells treated with apoptotic anti-FAS mAb CH-11 were determined. U87 cell viability after CH-11 treatment (24 hr) was reduced to ~45% of that in untreated controls, an effect that was completely reversed by pre-incubating cells with HGF in the presence of an irrelevant isotype control antibody but not by HGF in the presence of L2G7 (Fig. 2e).

2. Effects of anti-HGF mAb in glioma xenograft tumor models

[0043] The ability of L2G7 to block multiple tumor-promoting activities of HGF suggested this mAb would have anti-tumor activity against at least HGF+/Met+ human tumors. The majority of gliomas appear to express Met and HGF (Rosen et al. Int. J. Cancer 67: 248, 1996). For the glioma cell lines U87 and U118, Met expression was confirmed by flow cytometric analysis, and ~20-35 ng/ml HGF in supernatants from 7-day old confluent cultures using an HGF-specific ELISA was detected. The anti-tumor effect of L2G7 in nude mouse models of pre-established U118 and U87 subcutaneous xenografts was determined. L2G7 was administered i.p. twice weekly after tumor sizes had reached ~50 mm³ as described (Kim et al., Nature 362: 841, 1993, which is herein incorporated by reference). At 100 µg (~5 mg/kg) per injection, L2G7 completely inhibited growth of U118 tumors (Fig. 3a). In the U87 xenograft model, either 50 µg or 100 µg L2G7 per injection not only inhibited tumor growth but actually caused tumor regression (Fig. 3b). Control mAb (100 µg per injection)

only slightly inhibited tumor growth compared to PBS control. L2G7 had no effect on the growth of U251 glioma tumor xenografts, which express Met but do not secrete HGF. These in vivo results demonstrate that L2G7 as a single agent prevents tumor growth by specifically blocking HGF activity.

[0044] Next, L2G7 efficacy was examined in mice bearing pre-established intracranial U87 glioma xenografts. Mice were implanted with U87 human malignant glioma cells (100,000 cells/animal) by stereotactic injection to the right caudate/putamen. L2G7 (100 µg/injection, i.p., twice weekly) administered from post-implantation day 5 through day 52 significantly prolonged animal survival (Fig. 3c). In control mice, median survival was 39 days and all mice died from progressive tumors by day 41. In contrast, all mice treated with L2G7 survived through day 70, and 80% survived through day 90, seven weeks after cessation of mAb treatment (Fig. 3c). In sacrificed mice, on day 21 after three doses of L2G7, control tumors were more than 10-fold larger than L2G7-treated tumors (6.6 ± 2.7 mm³ vs. 0.54 ± 0.17 mm³) (Fig. 3d).

[0045] To test the mAb efficacy under even more stringent conditions, in a similar experiment initiation of L2G7 treatment was delayed until day 18. A subset of mice ($n = 5$ per group) was sacrificed early in the course of treatment, and tumor volumes were quantified by measuring tumor cross-sectional areas of H&E stained brain sections using computer assisted image analysis. L2G7 induced substantial tumor regression (Fig. 3e, f). Specifically, pre-treatment tumor volumes on day 18 were 26.7 ± 2.5 mm³ (range 19.5-54 mm³, median 27.9 mm³). On day 29, after 3 doses of L2G7, tumors were only 11.7 ± 5.0 mm³ (range 0-26.2 mm³, median 7.5 mm³), so the tumors had actually regressed or shunk in size on average by 50% or more. Tumor volumes on day 29 from mice treated with isotype-matched control mAb were 134.3 ± 22.0 mm³ (range 71.2-196.8 mm³, median 128 mm³). Hence, tumors treated with control mAb grew nearly 5 fold with a mean volume 12 times larger than the L2G7-treated tumors. In the mice that were not sacrificed ($n = 10$ per group), median survival in the control mice was 32 days and all died by day 42, while none of the L2G7-treated mice died until day 46, and L2G7 extended median survival to day 61. Thus, L2G7 induced tumor regression in mice with very high tumor burdens.

[0046] A more detailed analysis of histological sections of intracranial tumors was performed to investigate potential mechanisms of the anti-tumor effects of L2G7 (Fig. 4). Following three doses of L2G7, tumor cell proliferation (Ki-67 index) and angiogenesis

(vessel density, i.e. area of anti-laminin stained tumor vessels as percent of tumor area) were reduced by 51% and 62% respectively, while the apoptotic index of tumor cells quantified by the number of activated caspase-3 positive cells was increased 6-fold. The pronounced tumor regression that occurred soon after initiating L2G7 therapy is indicative of a cell death response similar to that observed in human colon tumor Colo 205 xenografts treated with an agonist anti-death receptor 4 (TRAIL1) mAb (Chuntharapai et al. J. Immunol. 166: 4891, 2001).

[0047] The results reported here are a striking example of brain tumor responses from a mAb not linked to a toxin or radionuclide. As a comparison, in subcutaneous xenograft models the anti-VEGF murine mAb A4.6.1, which was later humanized to create the drug Avastin®, inhibited growth of the G55 human glioma by only ~50-60% (Kim et al., Nature 362: 841, 1993), contrasted with essentially complete growth inhibition of the U87 and U118 gliomas by mAb L2G7. In an orthotopic intracranial tumor model, systemic anti-VEGF mAb administered simultaneously with G55 glioma cell implantation prolonged animal survival by only 2-3 weeks (Rubenstein et al. Neoplasia 2: 306, 2000). Similarly, systemic administration of a mAb to a variant of the EGF receptor prolonged median survival of mice with intracranial xenografts of glioma cells transfected with the variant EGF receptor, in general modestly (from 13 to 21 days or from 13 to 19 days, but in one case from 19 days to 58 days; Mishima et al., Cancer Res. 61: 4349, 2001). However, these modest effects were achieved when mAb administration began simultaneously with or shortly after xenograft implantation and hence were likely caused, at least in part, by delaying the initiation of xenograft vascularization, an event that cannot be targeted in patients with pre-existing brain tumors. In contrast, systemic administration of anti-HGF mAb L2G7 prolonged survival and caused tumor regression even when administered on Day 5 or even Day 18 after implantation when the tumors were well-established, and thus corresponds to the situation in human patients.

[0048] The pronounced anti-tumor effects of mAb L2G7 are likely due to the unique multifunctional properties of its molecular target HGF, i.e., mitogenic, angiogenic, and cytoprotective (Birchmeier et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 915, 2003; Trusolino et al. Nat. Rev. Cancer 4: 289, 2002). The ability of L2G7 to induce glioma regression implicates a cell death response that could result from Fas-mediated apoptosis, which is blocked by HGF binding to Met (Wang et al. Cell. 9 : 411, 2002) or from inactivating HGF-induced cytoprotective pathways that involve phosphatidyl inositol 3-kinase, Akt, and NF-kappaB intermediates (Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005). The ability of L2G7 to block the

cytoprotective and angiogenic effects of HGF predicts that L2G7 delivered systemically potentiates cytotoxic modalities such as γ -radiation and chemotherapy currently used to treat malignant brain tumors.

[0049] Although the invention has been described with reference to the presently preferred embodiments, it should be understood that various modifications can be made without departing from the invention.

[0050] All publications, patents and patent applications cited are herein incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent and patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety for all purposes.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of treating a brain tumor in a patient comprising systemically administering a monoclonal antibody (mAb) to a patient having a brain tumor and thereby treating the brain tumor.
2. The method of claim 1 wherein the mAb is chimeric, humanized or human.
3. The method of claim 1 wherein the mAb is a neutralizing anti-HGF mAb.
4. The method of claim 2 wherein the mAb is a humanized L2G7 mAb.
5. The method of claim 1 wherein the mAb is administered intravenously.
6. The method of claim 1 wherein the brain tumor is a glioma.
7. The method of claim 6 wherein the brain tumor is a glioblastoma.
8. The method of claim 1 wherein the patient is human.
9. The method of claim 1 wherein the patient is also treated with radiation therapy.
10. The method of claim 1 wherein the mAb is administered together with one or more other active anti-cancer drugs.
11. The method of claim 1 wherein the mAb binds to a growth factor selected from the group consisting of: vascular endothelial cell growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NT-3, transforming growth factor (TGF)-alpha (TGF- α), TGF- β 1, TGF- β 2, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), heregulin, epiregulin, emphiregulin, neuregulin (NRG)-1alpha (NRG-1 α), NRG-1 β , NRG-2 α , NRG-2 β , NRG-3, NRG-4, insulin-like growth factor (IGF)-1 (IGF-1), IGF-2, acidic fibroblast growth factor (FGF) (FGF-1), basic FGF (FGF-2), and FGF-n, where n is any number from 3 to 23.

12. A method of causing regression of a brain tumor in a patient comprising systemically administering a monoclonal antibody (mAb) to a patient having a brain tumor and thereby causing regression of the brain tumor.
13. The method of claim 12 wherein the mAb is chimeric, humanized or human.
14. The method of claim 12 wherein the mAb is a neutralizing anti-HGF mAb.
15. The method of claim 13 wherein the mAb is a humanized L2G7 mAb.
16. The method of claim 12 wherein the mAb is administered intravenously.
17. The method of claim 12 wherein the brain tumor is an astrocytoma.
18. The method of claim 17 wherein the brain tumor is a glioblastoma.
19. The method of claim 12 wherein the regression is total regression.
20. The method of claim 12 further comprising treating the patient with radiation therapy.
21. The method of claim 12 wherein the mAb is administered together with one or more other active anti-cancer drugs.
22. The method of claim 12 wherein the mAb binds to a growth factor selected from the group consisting of: vascular endothelial cell growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NT-3, transforming growth factor (TGF)-alpha (TGF- α), TGF- β 1, TGF- β 2, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), heregulin, epiregulin, emphiregulin, neuregulin (NRG)-1alpha (NRG-1 α), NRG-1 β , NRG-2 α , NRG-2 β , NRG-3, NRG-4), insulin-like growth factor (IGF)-1 (IGF-1), IGF-2, acidic fibroblast growth factor (FGF) (FGF-1), basic FGF (FGF-2), and FGF-n, where n is any number from 3 to 23.
23. The use of a neutralizing anti-HGF antibody in the manufacture of a medicament for treatment of a brain tumor by systemic administration.

1/4

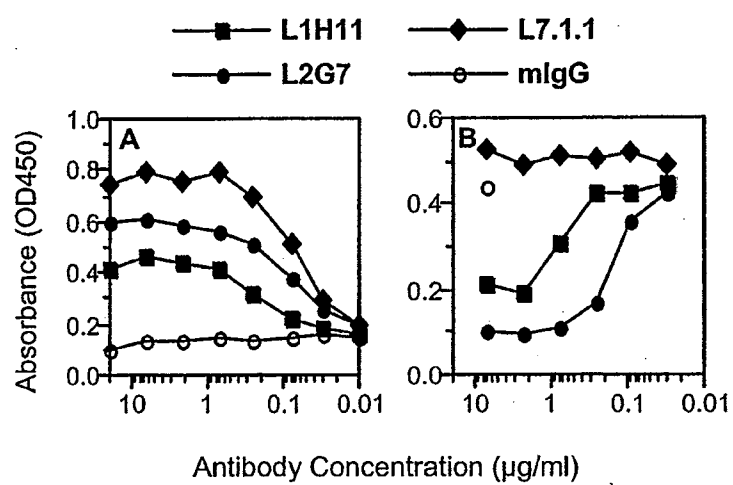


Figure 1

28

2/4

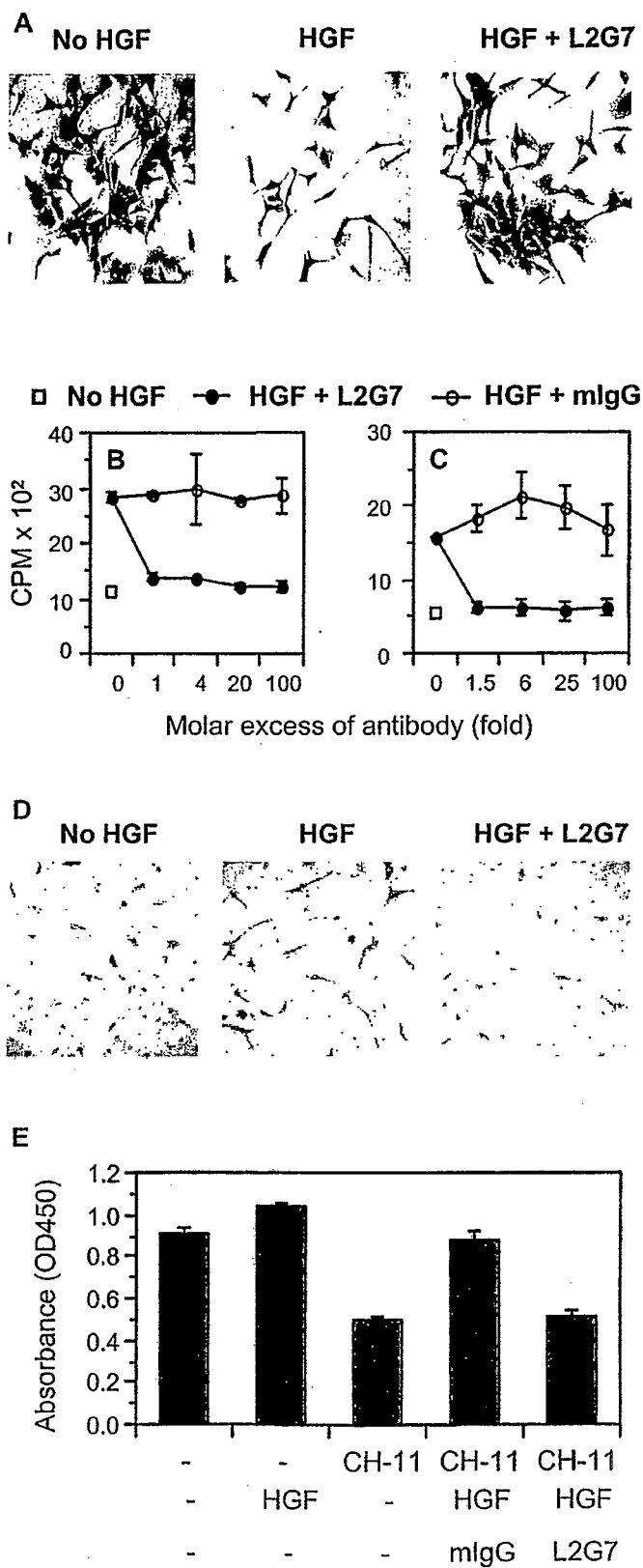


Figure 2

3/4

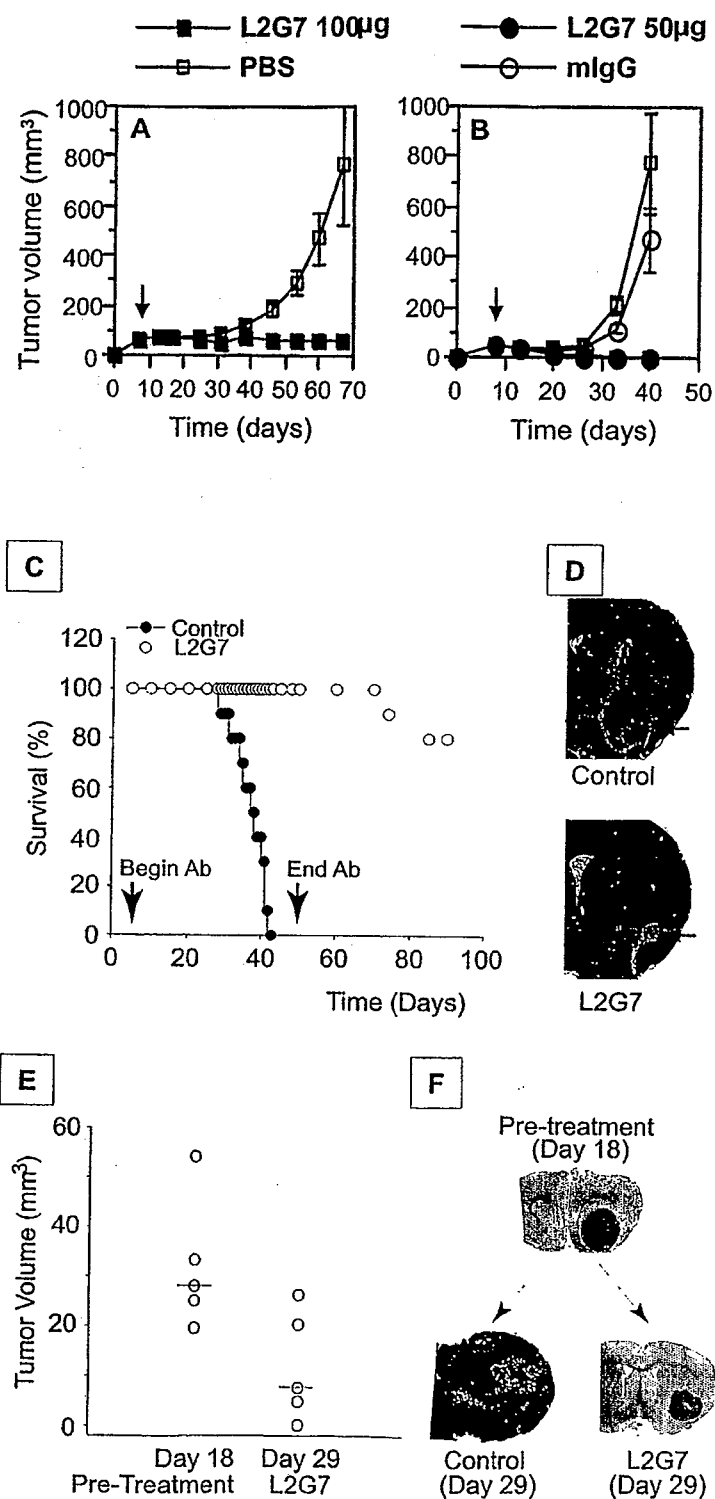


Figure 3

30

4/4

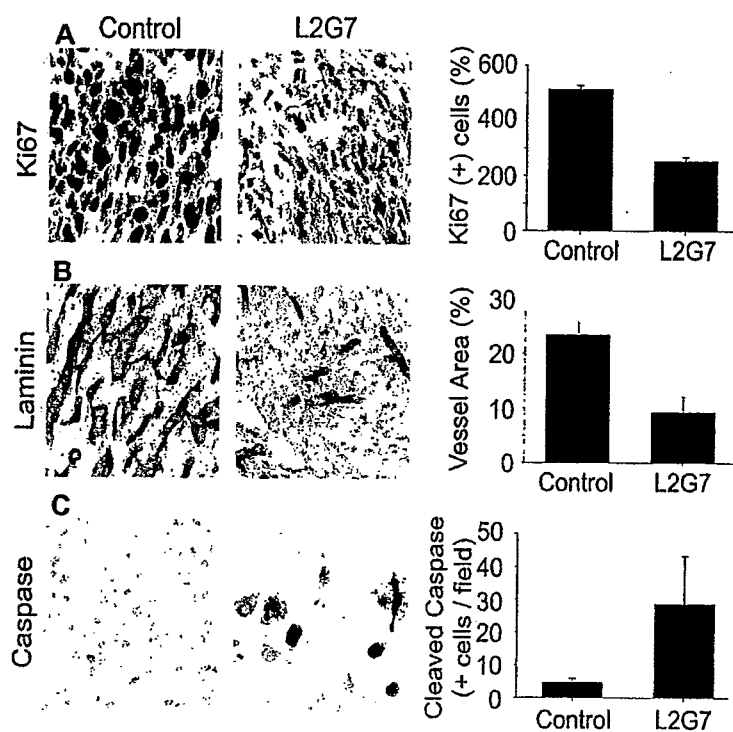


Figure 4

**MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES DE CEREBRO CON
ANTICUERPOS**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención es concerniente en general con
5 el tratamiento de tumores del cerebro con anticuerpos y más en
particular, por ejemplo, con el tratamiento de tumores del
cerebro con anticuerpos monoclonales que se enlazan a y
neutralizan el factor de crecimiento de hepatocito

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor de crecimiento de hepatocito humano (HGF)
es un polipéptido heterodimérico multifuncional producido por
células mesenquimales. Se ha demostrado que HGF estimula la
angiogénesis, morfogénesis y mitogénesis, también como el
15 crecimiento y dispersión de varios tipos de células (Bussolino
et al., J. Cell. Biol. 119: 629, 1992; Zarnegar y
Michalopoulos, J. Cell. Biol. 129:1177, 1995; Matsumoto et al.,
Ciba. Found. Symp. 212:198, 1997; Birchmeier y Gherardi, Trends
Cell. Biol. 8:404, 1998; Xin et al., Am. J. Pathol. 158:1111,
20 2001). Las actividades pleiotrópicas de HGF son moderadas por
medio de su receptor, una cinasa de tirosina de transmembrana
codificada por el proto-oncógeno cMet. Además, de regular una
variedad de funciones celulares normales, HGF y su receptor c-Met
han mostrado estar involucrados en el inicio, invasión y
25 metástasis de tumores (Jeffers et al., J. Mol. Med. 74:505,

1996; Comoglio y Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). HGF/cMet son co-expresados, frecuentemente sobre-expresados, sobre varios tumores sólidos humanos en los que se incluyen tumores derivados de pulmón, colon, recto, estómago, riñón, ovario, piel, mieloma múltiple y tejido de tiroide (Prat et al., Int. J. Cancer 49:323, 1991; Chan et al., Oncogene 2:593, 1988; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993; Derksen et al., Blood 99:1405, 2002). HGF actúa como un factor de crecimiento autócrino (Rong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4731, 1994; Koochekpour et al., Cancer Res. 57:5391, 1997) y parácrino (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993) y regulador anti-apoptótico (Gao et al., J. Biol. Chem. 276:47257, 2001) para estos tumores. Así, moléculas antagonistas, por ejemplo anticuerpos, que bloquean la ruta HGF-cMet tienen potencialmente potencial terapéutico anti-cáncer amplio.

HGF es una proteína de 102 kDa con secuencia y similaridad estructural a plasminógeno y otras enzimas de coagulación de la sangre (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993, cada uno de los cuales es incorporado en la presente por referencia). El HGF humano es sintetizado como un precursor del aminoácido 728 (preproHGF), que sufre escisión intracelular a una forma de una sola cadena inactiva (proHGF) (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Rosen et al., J. Cell. Biol.

127:1783, 1994). Después de la secreción extracelular, el proHGF es escindido para producir la molécula heterodimérica disulfuro-enlazada biológicamente activa compuesta de una subunidad α y subunidad β (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Naldini et al., EMBO J. 11:4825, 1992). La subunidad α contiene 440 residuos (69 kDa con glicosilación), que consiste del dominio de hairpin de N-terminal y cuatro dominios kringle. La subunidad β contiene 234 residuos (34 kDa) y tiene un dominio semejante a proteasa de serina, que carece actividad proteolítica. La escisión de HGF es requerida para la activación de receptor, pero no para el enlace de receptor (Hartmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11574, 1992; Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1992). HGF contiene 4 sitios de N-glicosilación supuestos, 1 en la subunidad α y 3 en la subunidad β . HGF tiene 2 sitios de enlace específicos de célula: un sitio de enlace de alta afinidad ($K_d = 2 \times 10^{-10}$ M) por el receptor cMet y un sitio de enlace de baja afinidad ($K_d = 10^{-9}$ M) para proteoglicanas de sulfato de heparina (HSPG), que están presentes sobre la superficie celular y matriz extracelular (Naldini et al., Oncogene 6:501, 1991; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Sakata et al., J. Biol. Chem., 272:9457, 1997). NK2 (una proteína que abarca del término N y primeros dos dominios kringle de la subunidad α) es suficiente para el enlace a cMet y activación de la cascada de señal por movilidad, sin embargo se requiere la proteína de

plena longitud para la respuesta mitogénica (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993). HSPG se enlaza a HGF al interactuar con el término N de HGF (Aoyama, et al., Biochem. 36:10286, 1997; Sakata, et al., J. Biol. Chem. 272:9457, 1997). Los papeles postulados para la interacción de HSPG-HGF incluyen la mejora de biodisponibilidad de HGF, actividad biológica y oligomerización (Bardelli, et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Zioncheck et al., J. Biol. Chem. 270:16871, 1995).

10 cMet es un miembro de la familia del receptor de cinasa de tirosina de proteína clase IV. El gen de cMet de plena longitud fue clonado e identificado como el proto-oncógeno de cMet (Cooper et al., Nature 311:29, 1984; Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987). El receptor
15 cMet es sintetizado inicialmente como un precursor parcialmente glicosilado de una sola cadena, p170(MET) (figura 1) (Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987; Giordano et al., Nature 339:155, 1989; Giordano et al., Oncogene 4:1383, 1989; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994). Después de a
20 glicosilación adicional, la proteína es escindida proteolíticamente a una proteína madura de 190 kDa heterodimérica (1385 aminoácidos), que consiste de la subunidad α de 50 kDa (residuos 1-307) y la subunidad β de 145 kDa. El dominio de cinasa de tirosina citoplásmico de la subunidad β
25 está involucrado en la transcripción de señal.

Se han investigado varios procedimientos diferentes para intentar obtener una molécula antagonista efectiva de HGF/cMET: proteínas HGF truncadas tales como NK1 (dominio N terminal más dominio kringle 1; Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1993), NK2 (dominio N terminal más dominios kringle 1 y 2; Chan et al., Science 254:1382, 1991) y NK4 (dominio N-terminal más cuatro dominio kringle; Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000) y mAbs anti-cMet (Dodge, Master's Thesis, San Francisco State University, 1998).

Más recientemente, Cao et al. (Proc. Natl Acad. Sci. USA. 98: 7443, 2001, que es incorporado en la presente por referencia) reportaron que la administración de una combinación de 3 mAbs a HGF inhibía el crecimiento de xenoinjertos de gliomas subcutáneos en ratones. WO 2005/017107 A2, que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad para todos los propósitos, reportó que el tratamiento con un solo mAb anti-HGF podría inhibir el crecimiento de xenoinjertos de glioma subcutáneos en ratones. Sin embargo, estas publicaciones no tratan la cuestión de si la administración sistémica de un anti-HGF u otro mAb puede inhibir el crecimiento de un tumor en el cerebro, en donde la barrera de sangre-cerebro presenta obstáculos (Rich et al., Nat. Rev. Drug Discov. 3: 430, 2004). Por supuesto, la ineficacia previamente observada por las terapias de anticuerpo sistémicas contra tumores del sistema nervioso central (CNS) ha sido atribuida a la permeabilidad

vascular restringida aún para metástasis de CNS (Bendell et al., Cancer 97: 2972, 2003).

Así, hay necesidad de un método para tratar tumores de cerebro mediante la administración sistémica de un mAb. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una modalidad, la invención proporciona un método de tratamiento de tumor de cerebro en un paciente mediante la administración sistémica de un mAb. El tumor de cerebro puede ser a glioma tal como un astrocitoma, por ejemplo, un glioblastoma. La administración puede ser, por ejemplo, mediante rutas intravenosa, intramuscular o subcutánea. En una modalidad preferida, el mAb es un mAb neutralizante al Factor de crecimiento de hepatocito (HGF) tal como un mAb L2G7 humanizado. En otra modalidad preferida, la administración sistémica de un mAb tal como un mAb anti-HGF neutralizante es usada para inducir la regresión de un tumor de cerebro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Actividades de enlace y bloqueo de mAbs anti-HGF medidas mediante ELISA. A. Para el enlace, mAbs fueron capturados sobre una placa de ELISA recubierta con IgG anti-ratón de cabra, bloqueado con BSA e incubado con HGF-Flag (1 µg/ml), seguido por mAb anti-bandera HRP-M2 (Invitrogen). B.

Para el bloqueo de HGF-bandera al enlace de Met-Fc, las placas fueron recubiertas con IgG-Fc anti-humano de cabra, bloqueado con BSA, incubado con Met-Fc (2 µg/ml) y luego con HGF-Flag (1 µg/ml) +/- mAbs anti-HGF. El HGF-Flag enlazado fue detectado
5 con HRP-M2 anti-Flag mAb.

Figura 2. Efectos de bloqueo de mAb L2G7 sobre las actividades de dispersión, mitogénicas, angiogénicas y anti-apoptóticas de HGF. A. Células MDCK (ATCC) fueron estimuladas con 50 ng/ml de HGF +/- 10 µg/ml L2G7 durante 2 días como se
10 describe (Cao et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 98: 7443, 2001). Se tomaron fotografías a una amplificación de 100x después que las células fueron teñidas con violeta cristal. B. Células epiteliales de pulmón de mink Mv 1 Lu (ATCC; 5 x 10⁴ células/ml) fueron incubadas en DMEM libre de suero con o sin
15 HGF (50 ng/ml) y L2G7 o mAb de control de isotipo apareado (mIgG) durante 24 horas y el nivel de proliferación celular fue determinado mediante adición de 3H-timidina por 6 horas. C. Como se describe (Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001), HUYEC (CAMBREX; 104 células/100 µl/cavidad) fueron incubadas en
20 EBM-2/0.1% FCS con o sin HGF (50 ng/ml) y L2G7 o mAb de control por 72 horas y el nivel de proliferación fue determinado mediante la adición de WST-I. D. como se describe (Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001), HUVEC (6 x 10⁴ células/100 µl/cavidad) en DMEM/gel fueron superpuestas con 100 µl/cavidad
25 de EMB-2/0.1% FCS/0.1% BSA con o sin 200 ng/ml de HGF +/- 20

µg/ml de L2G7. Después de una incubación de 48 horas, las células fueron fijadas y teñidas utilizando azul de toluidina y se tomaron fotografías una amplificación de 40X. E. Como se describe (Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005), células de tumor
5 U87 en DMEM libre de suero fueron tratadas con o sin HGF (20 ng/ml) +/- mAb L2G7 (20 µg/ml) o anticuerpo de control de isotipo (mIgG) por 48 horas y luego con anticuerpo anti-Fas mAb CH-11 (Upstate Biotechnology, 40 ng/ml) durante 24 horas y la viabilidad celular fue determinada mediante la adición de WST-
10 I. En b, c y e, los valores son la media +/- desviación estándar.

Figura 3. Inhibición o regresión de xenoinjertos de tumor de glioma mediante L2G7. Células tumor de glioma U118 (A) o U87 (B) fueron implantadas subcutáneamente a ratones
15 Beige/Desnudos NIH III y el tamaño de tumor fue monitoreado como se describe (Kim et al., Nature 362: 841, 1993). Después que el tamaño del tumor había alcanzado ~50 mm³, grupos de ratones (n = 6 ó 7) fueron tratados dos veces a la semana i.p. con 50 ó 100 µg de L2G7 ó 100 µg de anticuerpo monoclonal de
20 control de isotipo apareado (mIgG) o PBS como se indica; las flechas muestran el primer día de tratamiento. Los valores son el volumen de tumor medio +/- s.e.m. C. Células de tumor U87 (105 por ratón) fueron inyectadas intracranealmente al caudate/putamen de ratones Scid/beige como se describe (Abounader et
25 al. FASEB J. 16, 108, 2002). Empezando y finalizando

respectivamente en el día 5 y día 52 como se indica por las flechas, los grupos de ratones ($n = 10$) fueron administrados i.p. con 100 μg de L2G7 o PBS dos veces a la semana y la sobrevivencia fue monitoreada. Los estudios de supervivencia fueron analizados mediante gráficas de Kaplan-Meier. D. Secciones de cerebro preparadas como se describe (Abounader et al. FASEB J. 16, 108, 2002) de ratones representativos sacrificados en el día 21, después de 3 dosis de tratamiento i.p. dos veces a la semanas con 100 μg de L2G7 o PBS, que muestran el tamaño de xenoinjertos intracraneales U87. E. Volúmenes de tumor U87 intracraneales en ratones individuales en el día 18 antes del inicio de tratamiento y en el día 29 después de tratamiento 3 veces con L2G7. F. Secciones de cerebro de ratones representativos en el día 18 antes del tratamiento y en el día 29 después de tratamiento con L2G7 o anticuerpo monoclonal de control.

Figura 4. Análisis histológicos de secciones de cerebro de ratones con xenoinjertos intracraneales U87. Los ratones fueron sacrificados después de tratamiento de tumores pre-establecidos con tres dosis dos veces a la semana de L2G7 o control. Secciones de cryostat fijados por perfusión fueron teñidas con H&E y el anticuerpo indicado y los índices cuantificados utilizando análisis de imagen auxiliada por computadora. A. Anti-Ki67 (DAKO) para detectar células proliferantes. B. Anti-laminina (Life Technologies) para

detectar vasos sanguíneos. C. Anticuerpo a caspasa-3 escindida (Cell Signaling Technology) para detectar respuestas de células de tumor apoptóticas.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para el tratamiento de tumores de cerebro mediante la administración sistémica de anticuerpo monoclonal neutralizante a HGF o anticuerpos contra otras citocinas tales como factores de
10 crecimiento o contra proteínas de superficie celular tales como receptores de citocina. Aunque no se requiere un entendimiento del mecanismo para la práctica de la invención, se cree que el éxito de la invención reside por lo menos en parte debido al paso de anticuerpo de la sangre a tumores de cerebro debido a
15 una barrera de sangre-cerebro defectuosa dentro de los tumores.

1. Anticuerpos

Los anticuerpos con moléculas complejas muy grandes (peso molecular de ~150,000 o aproximadamente 1320 aminoácidos)
20 con estructura interna intrincada. Una molécula de anticuerpo natural contiene dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada. Cada cadena ligera y cada cadena pesada a su vez consiste de dos regiones: una región variable ("V") involucrada en el enlace
25 del anticuerpo objetivo y una región constante ("C") que

YI

interactúa con otros componentes del sistema inmune. Las regiones variables de cadena ligera y pesada se pliegan conjuntamente en el espacio tridimensional para formar una región variable que se enlaza al antígeno (por ejemplo, un receptor sobre la superficie de una célula). Dentro de cada
5 región variable de cadena ligera o cadena pesada, hay 3 segmentos cortos (en promedio de 10 aminoácidos de longitud) llamados las regiones que determinan la complementareidad ("CDR"). Las seis CDR en un dominio variable de anticuerpo
10 (tres de la cadena ligera y tres de la cadena pesada) se pliegan conjuntamente en el espacio tridimensional para formar el sitio de enlace de anticuerpo real que se bloquea sobre el antígeno objetivo. La posición y longitud de las CDR se han definido de manera precisa. Kabat, E. et al., Sequences of
15 Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987. La parte de una región variable no contenida en las CDR es llamada la estructura, que forma el medio ambiente para las CDR.

Un anticuerpo monoclonal (mAb) es una sola especie
20 molecular de anticuerpo y por consiguiente no abarca anticuerpos policlonales producidos al inyectar un animal (tal como un roedor, conejo o cabra) con un antígeno y extraer suero del animal. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo diseñado genéticamente (monoclonal) el cual las CDR de un anticuerpo de
25 ratón ("anticuerpo donador", que puede también ser de una

especie de rata, hámster u otra especie similar) son injertados sobre un anticuerpo humano ("anticuerpo aceptor"). Los anticuerpos humanizados pueden también ser elaborados con menos de las CDR completas de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, 5 Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). Así, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene CDR de un anticuerpo donador y estructura de región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano. Además, con el fin de retener alta afinidad de enlace, por lo menos uno de los dos 10 elementos estructurales adicionales pueden ser empleados. Véase, patente estadounidense No. 5,530,101 y 5,585,089, cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia, que proporcionan instrucciones detalladas para la construcción de anticuerpos humanizados.

15 En el primer elemento estructural, la estructura de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado es escogida para tener máxima identidad de secuencia (entre 65% y 95%) con la estructura de la región variable de cadena pesada del anticuerpo donador, al seleccionar apropiadamente el 20 anticuerpo aceptor de entre los muchos anticuerpos humanos conocidos. En el segundo elemento estructural, al construir el anticuerpo humanizado, aminoácidos seleccionados en la estructura del anticuerpo aceptor humano (al exterior de las CDR) son reemplazados con aminoácidos correspondientes del 25 anticuerpo donador, de acuerdo con reglas especificadas.

Específicamente, los aminoácidos a ser reemplazados en la estructura son escogidos en base de su habilidad para interactuar con las CDR. Por ejemplo, los aminoácidos reemplazados pueden estar adyacentes a una CDR en la secuencia
5 de anticuerpo donador o dentro de 4-6 ángstroms de una CDR en el anticuerpo humanizado tal como se mide en el espacio tridimensional.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el cual la región variable de un anticuerpo de ratón (u otro roedor) es
10 combinada con la región constante de un anticuerpo humano; su construcción por medio de ingeniería genética es bien conocida. Tales anticuerpos retienen la especificidad de enlace del anticuerpo de ratón, en tanto que son aproximadamente dos-tercios humanos. La proporción de secuencia no humana presente
15 en anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados sugiere que la inmunogenicidad de anticuerpos quiméricos es intermedia entre anticuerpos de ratón y humanizados. Otros tipos de anticuerpos diseñados genéticamente pueden tener inmunogenicidad reducida en relación con anticuerpos de ratón
20 incluyen anticuerpos humanos elaborados utilizando métodos de despliegue de fago (Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; y Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998, cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia) o usando animales transgénicos

(Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741, cada uno de los cuales es incorporado en la presente por referencia).

Como se usa en la presente, el término anticuerpo "semejante a humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal en el cual una porción sustancial de la secuencia de aminoácidos de una o ambas cadenas (por ejemplo, aproximadamente 50% o más) se origina de genes de inmunoglobulina humanos. De aquí, los anticuerpos semejantes a humano abarcan pero no están limitados a anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos. Como se usa en la presente, un anticuerpo de "inmunogenicidad reducida" es uno que se espera que tenga significativamente menos inmunogenicidad que un anticuerpo de ratón cuando es administrado a pacientes humanos. Tales anticuerpos abarcan anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, también como anticuerpos elaborados al reemplazar aminoácidos específicos en anticuerpos de ratón que pueden contribuir a epítopos de célula B o células T, por ejemplo residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). Como se usa en la presente, un anticuerpo "diseñado genéticamente" es uno para el cual los genes han sido contruidos o puestos en un medio ambiente no natural (por ejemplo, genes humanos en un ratón o sobre un bacteriófago) con la ayuda de técnicas de ADN recombinantes y por consiguiente, no abarcaría un anticuerpo monoclonal de ratón elaborado con tecnología de hibridomà convencional.

El epítopo de un anticuerpo monoclonal es la región de su antígeno al cual el anticuerpo monoclonal se enlaza. Dos anticuerpos se enlazan al mismo o al epítopo superpuesto si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) el enlace del otro al antígeno. Esto es, un exceso de 1x, 5x, 10x, 20x o 100x de un anticuerpo inhibe el enlace del otro por al menos 50% pero preferiblemente 75%, 90% o aún 99%, tal como se mide en un análisis de enlace competitivo (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990, que es incorporado en la presente por referencia). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan el enlace de un anticuerpo reducen o eliminan el enlace del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos traslapantes o superpuestos si algunas mutaciones de aminoácido que reducen o eliminan el enlace de un anticuerpo, reducen o eliminan el enlace del otro.

2. Anticuerpos anti-HGF neutralizantes

Un anticuerpo monoclonal (mAb) que se enlaza a HGF (esto es, un anticuerpo monoclonal anti-HGF) se dice que neutraliza HGF o es neutralizante, si el enlace inhibe parcial o completamente una o más actividades biológicas de HGF (esto es, cuando el anticuerpo monoclonal es usado como un solo agente). De entre las propiedades biológicas de HGF que un anticuerpo neutralizante puede inhibir están la habilidad del HGF para enlazarse a su receptor cMet, para provocar la

dispersión de ciertas líneas celulares tales como células de riñón canino Madin-Darby (MDCK); estimular la proliferación de (esto es, ser mitogénicas para) ciertas células en las que se incluyen hepatocitos, células epiteliales de mono 4MBr-5 y
5 varias células de tumor humano; o estimular la angiogénesis, por ejemplo tal como se mide mediante estimulación de proliferación de célula endotelial vascular humana (HUVEC) o formación de tubo o mediante inducción de vasos sanguíneos cuando es aplicado a la membrana corioalantoica de embrión de
10 pollo (CAM). Los anticuerpos usados en la invención se enlazan preferiblemente a HGF, esto es, a la proteína codificada por la secuencia de GenBank con el número de Acceso D90334. Similarmente, un anticuerpo neutralizante, esto es, antagonista contra cualquier citocina o receptor de citocina puede inhibir
15 el enlace de la citocina al receptor y/o inhibir la transmisión de una señal a la célula mediante la citocina. Si la citocina es un factor de crecimiento, tal anticuerpo puede inhibir la proliferación de células inducidas por la citocina.

Un anticuerpo monoclonal neutralizante usado en la
20 invención inhibe comúnmente a una concentración de, por ejemplo 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ó 50 µg/ml de una función biológica de una citocina, por ejemplo, HGF (por ejemplo, estimulación de proliferación o angiogénesis) por aproximadamente por lo menos 50% pero preferiblemente 75%; más
25 preferiblemente por 90% o 95% o aún 99% y más preferiblemente

aproximadamente 100% (esencialmente por completo) tal como se analiza mediante métodos descritos bajo ejemplos o conocidos en el arte. Comúnmente, la extensión de inhibición es medida cuando la cantidad de citocina usada es solo suficiente para
5 estimular plenamente la actividad biológica o es 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3 ó 10 µg/ml. Preferiblemente, por lo menos 50%, 75%, 90% o 95% o esencialmente una inhibición completa es obtenida cuando la proporción molar de anticuerpo a citocina es 0.5x, 1x, 2x, 3x, 5x ó 10x. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal
10 es neutralizante, esto es, inhibe la actividad biológica, cuando usado como un solo agente, pero en algunos métodos, dos anticuerpos monoclonales son usados conjuntamente para dar inhibición. Más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal neutraliza no solo una sino varias de las actividades
15 biológicas listadas anteriormente; por propósitos en la presente, un anticuerpo monoclonal anti-HGF que usado como un solo agente neutraliza todas las actividades biológicas de HGF es llamado "plenamente neutralizante" y tales anticuerpos monoclonales son más preferibles. Los anticuerpos monoclonales
20 usados en la invención son preferiblemente para ser específicos para HGF, esto es no se enlazan o solamente se enlazan a una extensión mucho menor, a proteínas que están relacionadas con HGF tales como factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los
25 anticuerpos monoclonales tienen comúnmente una afinidad de

enlace (K_a) de por lo menos 10^7 M^{-1} pero preferiblemente 10^8 M^{-1} o más alta y más preferiblemente 10^9 M^{-1} o más alta o aún 10^{10} M^{-1} ó más alta.

Los anticuerpos monoclonales usados en la invención
5 incluyen anticuerpos en su forma tetramérica natural (2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas) y puede ser de cualquiera de los isotipos conocidos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE y sus subtipos, esto es, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanos y IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3 de ratón. Los anticuerpos monoclonales también se proponen
10 incluir fragmentos de anticuerpos tales como Fv, Fab y F(ab')₂; anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), anticuerpos de una sola cadena (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); y anticuerpos con
15 regiones constantes alteradas (por ejemplo, patente estadounidense No. 5,624,821). Los anticuerpos monoclonales pueden ser de origen animal (por ejemplo, ratón, rata, hámster o pollo) o pueden ser diseñados genéticamente. Los anticuerpos monoclonales de roedor son fabricados mediante métodos estándar
20 bien conocidos en el arte, que comprenden inmunización múltiple con HGF en adyuvante i.p. apropiado, i.v. o al cuarto trasero, seguido por extracción de células de bazo o células de nodo linfático y fusión con una línea celular inmortalizada apropiada y luego selección de hibridomas que producen enlace
25 de anticuerpo a HGF, por ejemplo, véase bajo la sección de

ejemplos. Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, elaborados mediante métodos conocidos en arte mencionados supra, son usados en modalidades preferidas de la invención. Los anticuerpos humanos elaborados, por ejemplo, mediante despliegue de fago o métodos de ratón transgénicos son también preferidos (véase por ejemplo, Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, supra). Más en general, anticuerpos de inmunogenicidad reducida, semejantes a humanos y diseñados genéticamente como se define en la presente son todos preferidos.

El anticuerpo monoclonal anti-HGF neutralizante L2G7 (depositado a la American Type Culture Collection bajo el número de ATCC PTA-5162 de acuerdo con el tratado de Budapest) es un ejemplo preferido de un anticuerpo monoclonal para uso en la invención. El depósito será mantenido en un depósito autorizado y reemplazado en el caso de mutación, no biodisponibilidad o destrucción por un período de por lo menos cinco años después de la petición más reciente por liberación de una muestra fue recibida por el depósito, por un período de por lo menos treinta años después de la fecha de depósito o durante la vida aplicable de la patente relacionada, en período que sea más largo. Todas las restricciones en cuanto a la disponibilidad al público de estas líneas celulares serán removidas irrevocablemente después de la expedición de una patente de la solicitud. Los anticuerpos monoclonales

neutralizantes con el mismo epítopo o epítopo traslapante como L2G7 proporcionan otros ejemplos. Variantes de L2G7 tales como una forma quimérica o humanizada de L2G7 son especialmente preferidas. Un anticuerpo monoclonal que compite con L2G7 por el enlace a HGF y neutraliza HGF en análisis in vitro o in vivo descritos en la presente es también preferido. Otras variantes de L2G7 tales como anticuerpos monoclonales que son 90%, 95% o 99% idénticos a L2G7 en secuencia de aminoácidos de región variable (por ejemplo, cuando son alineados por el Sistema de numeración de Kabat; Kabat et al., op. cit)., por lo menos en las CDR y mantiene su propiedades funcionales o que difieren de la misma por número pequeño de sustituciones de aminoácido inconsecuenciales funcionalmente (por ejemplo, sustituciones conservadoras), cancelaciones o inserciones pueden también ser usados en la invención. Otros anticuerpos monoclonales preferidos incluyen anticuerpos monoclonales semejantes a humanos, de inmunogenicidad reducida y diseñados genéticamente como se define en la presente.

Cualesquier sustituciones de aminoácido de inmunoglobulinas ejemplificadas son preferiblemente sustituciones de aminoácido conservadoras. Por propósitos de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos pueden ser agrupados como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys,

ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influencian la orientación de cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe.

5 Las sustituciones conservadoras involucran sustituciones entre aminoácidos en la misma Clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Todavía otros anticuerpos menos preferidos para uso
10 en la presente invención incluyen todos los anticuerpos menos anti-HGF descritos en US 2005/0019327 A1 o WO 2005/017107 A2, ya sea explícitamente por nombre o secuencia o implícitamente por descripción o relación con anticuerpos monoclonales descritos explícitamente (ambas solicitudes citadas son
15 incorporadas en la presente por referencia por su revelación de anticuerpos y todos los otros propósitos). Anticuerpos menos especialmente preferidos son aquellos producidos por los hibridomas designados en la presente como 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1
20 y definido respectivamente por sus secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera proporcionadas por SEQ ID Nos. 24-43 de WO2005/017107 A2; los anticuerpos monoclonales que poseen las mismas CDR respectivas como cualquiera de estos anticuerpos monoclonales enlistados;
25 anticuerpos monoclonales que tienen regiones variables de

cadena ligera y cadena pesada que son por lo menos 90%, 95% o 99% idénticas a las regiones variables respectivas de estos anticuerpos monoclonales enlistados o que difieren de ellos solamente por sustituciones de aminoácido inconsecuenciales, cancelación o inserciones; anticuerpos monoclonales que se enlazan al mismo epítipo de HGF como cualquiera de estos anticuerpos monoclonales enlistados y todos los anticuerpos monoclonales abarcados por las reivindicaciones 1 a 94 en la misma. Las identidades de secuencia son determinadas entre 10 secuencias de región variable de inmunoglobulina alineadas utilizando la convención de numeración de Kabat.

En otras modalidades, un anticuerpo monoclonal para uso en la invención, esto es, para tratamiento de un tumor de cerebro mediante administración sistémica del anticuerpo monoclonal, se enlaza a uno o más de los siguientes factores de 15 crecimiento: factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF); una neurotrofina tal como factor de crecimiento de nervio (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o NT-3; un factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa o TGF-beta (TGF- β 1 y/o TGF- β 2); factor de crecimiento derivado 20 de plaqueta (PDGF); factor de crecimiento epidérmico (EGF); heregulina; epiregulina; enfiregulina; una neuregulina (NRG-1 α . y/o NRG-1 β , NRG-2 α y/o NRG-2 β , NRG-3 ó NRG-4), factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1 y IGF-2); o en una 25 modalidad preferida un factor de crecimiento de fibroblasto

(FGF) especialmente FGF ácido (FGF-1) o más preferiblemente FGF básico (FGF-2), pero alternativamente FGF-n, en donde n es cualquier número de 3 a 23. En general, tal anticuerpo monoclonal es neutralizante. En todavía otras modalidades, el anticuerpo monoclonal para uso en la invención se enlaza a un receptor celular para cualquiera de uno o más de los factores de crecimiento mencionados anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales naturales para uso en la invención pueden ser producidos a partir de sus hibridomas. Los anticuerpos monoclonales diseñados genéticamente, por ejemplo, anticuerpos menos quiméricos o humanizados, pueden ser expresados mediante una variedad de métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, genes que codifican sus regiones de cadena V ligera y pesada pueden ser sintetizado a partir de oligonucleótidos trasplantes e insertados conjuntamente con regiones C disponibles a vectores de expresión (por ejemplo, disponibles comercialmente de Invitrogen) que proporcionan las regiones reguladoras necesarias, por ejemplo promotores, mejoradores, sitios poly A, etc. El uso del promotor-mejorador de CMV es preferido. Luego los vectores de expresión pueden ser transfectado utilizando varios métodos bien conocidos tales como lipofección o electroporación a una variedad de líneas celulares mamíferas tales como CHO o mielomas no productoras que incluyen Sp2/0 y NSO y células que expresan los anticuerpos seleccionados mediante selección de antibióticos apropiada.

Véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,530,101. Cantidades más grandes de anticuerpos pueden ser producidas al cultivar las células en bioreactores disponibles comercialmente.

5 Una vez expresados, los anticuerpos monoclonales u otros anticuerpos para uso en la invención pueden ser purificados de acuerdo con procedimientos estándar del arte tales como microfiltración, ultrafiltración, cromatografía de afinidad de proteína A o G, cromatografía de exclusión de
10 tamaño, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y/u otras formas de cromatografía de afinidad a base de tintes orgánicos o los semejantes. Los anticuerpos sustancialmente puros de por lo menos aproximadamente 90 ó 95% de homogeneidad son preferidos y 98% o
15 99% o más homogeneidad más preferido, para usos farmacéuticos.

3. Métodos Terapéuticos

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un método de tratamiento con una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal descrito en
20 la presente. Formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos contienen el anticuerpo monoclonal en un portador aceptable fisiológicamente, opcionalmente con excipientes o estabilizadores, en la forma de soluciones liofilizadas o acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables
25 son no tóxicos a los receptores a las dosificaciones y

55

concentraciones empleadas e incluyen soluciones reguladoras del pH tales como fosfato, citrato o acetato a un pH comúnmente de 5.0 a 8.0, más frecuentemente 6.0 a 7.0; sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para fabricar isotónicas; antioxidantes, conservadores, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrofílicos tales como polysorbate 80, aminoácidos, carbohidratos, agentes quelantes, azúcares y otros ingredientes estándares conocidos para aquellos experimentados en el arte (Remington's Pharmaceutical Science 16a edición, Osol, A. Ed. 1980). El anticuerpo está comúnmente presente a una concentración de 1 - 100 mg/ml, por ejemplo, 10 mg/ml. El anticuerpo monoclonal puede también estar encapsulado en agentes portadores tales como liposomas.

En otra modalidad preferida, la invención proporciona un método de tratamiento de un paciente con un tumor de cerebro mediante administración sistémica de un anticuerpo monoclonal, tal como anticuerpo monoclonal anti-HGF neutralizante o un anticuerpo contra una citocina o su receptor. El paciente es preferiblemente humano pero puede ser cualquier mamífero. Administración sistémica significa una ruta de administración en la cual el anticuerpo monoclonal tiene acceso general al sistema circulatorio y por consiguiente a los órganos del cuerpo, en los que se incluyen los vasos sanguíneos del cerebro. En otras palabras, el anticuerpo monoclonal es administrado en el lado periférico de la barrera de sangre-

cerebro. Ejemplos de administración sistémica incluyen infusión intravenosa o inyección de bolo o intramuscular o subcutánea o intraperitonealmente. Sin embargo, la administración sistémica no abarca inyección directamente al tumor o a un órgano tal como el cerebro o sus membranas circundantes o fluido cerebrospinal. La intravenosa infusión puede ser dada en tanto como 15 minutos, pero más frecuentemente por 30 minutos o durante 1, 2, 3 o aún 4 o más horas. La dosis dada es suficiente para curar, para aliviar por lo menos parcialmente o inhibir el desarrollo adicional de la condición que es tratada ("dosis terapéuticamente efectiva"). Una dosis terapéuticamente efectiva preferiblemente provoca la regresión o más preferiblemente eliminación del tumor. Una dosificación terapéuticamente efectiva es usualmente de 0.1 a 5 mg/Kg de peso corporal, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 mg/Kg, pero puede ser tan alta como 10 mg/Kg o aún 15 ó 20 mg/Kg. Una dosis unitaria fija puede también ser dada, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 ó 1000 mg o la dosis puede estar basada en el área superficial de paciente, por ejemplo 100 mg/m². Una dosificación terapéuticamente efectiva administrada a una frecuencia suficiente para curar, aliviar por lo menos parcialmente o inhibir el desarrollo adicional de la condición que es tratada es denominada como un régimen terapéuticamente efectivo. Tal régimen provoca preferiblemente la regresión o más preferiblemente eliminación del tumor. Usualmente entre 1 y 8

dosis, (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) son administrados para tratar el cáncer, pero 10, 20 o más dosis pueden ser dadas. El anticuerpo monoclonal puede ser administrado diariamente, bisemanalmente, semanalmente, una semana si y otra
5 no, mensualmente o algún otro intervalo, dependiendo, por ejemplo de la vida media del anticuerpo monoclonal, por 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 3-6 meses o más. Cursos repetidos de tratamiento son también posibles, como es la administración crónica.

10 Los métodos de esta invención, por ejemplo, administración sistémica de un anticuerpo monoclonal tal como anticuerpo monoclonal anti-HGF, especialmente L2G7 y sus variantes en los que se incluyen L2G7 humanizado, pueden ser usados para tratar todos los tumores de cerebro en los que se
15 incluyen meningiomas; gliomas en los que se incluyen ependimomas, oligodendrogliomas y todos los tipos de astrcitomas (bajo grado, anaplásico o glioblastoma multiforme o simplemente glioblastoma); medulablastomas, gangliogliomas, schwannomas, cordomas; y tumores de cerebro principalmente de
20 niños en los que se incluyen tumores neuroectodérmicos primitivos. Tanto tumores de cerebro primarios (esto es, que surgen en el cerebro) y tumores de cerebro secundarios o metastáticos pueden ser tratados mediante los métodos de la invención. Los tumores de cerebro que expresan Met y/o HGF,
25 especialmente a niveles elevados, son particularmente

apropiados para tratamiento mediante administración sistémica de un anticuerpo anti-HGF neutralizante tal como L2G7 o sus variantes.

En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal es administrado conjuntamente en combinación con (esto es, antes, durante o después) otra terapia anti-cáncer. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo m anti-HGF tal como L2G7 y sus variantes, puede ser administrado conjuntamente con uno o más de los otros fármacos quimioterapéuticos conocidos para aquellos de habilidad en el arte de oncología, por ejemplo agentes alquilantes tales como carmustina, clorambucilo, cisplatina, carboplatina, oxiplatina, procarbazona y ciclofosfamida; antimetabolitos tales como fluorouracilo, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, metotrexato e hidroxiurea; productos naturales en los que se incluyen alcaloides de planta y antibióticos tales como bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, etopósido, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vincristina y taxol (paclitaxel) o compuestos relacionados tales como Taxotere®; agentes aprobados específicamente para tumores de cerebro en los que se incluyen temozolomida y plaqueta de Gliadel® que contiene carmustina; y otros fármacos en los que se incluyen irinotecana y Gleevec® y todos los agentes anti-cáncer aprobados y experimentales enlistados en WO 2005/017107 A2 (que es incorporado en la presente por referencia). El

anticuerpo monoclonal puede ser administrado en combinación con 1, 2, 3 o más de estos agentes, por ejemplo, en un régimen quimioterapéutico estándar. Otros agentes con los cuales un anticuerpo monoclonal anti-HGF puede ser administrado incluyen biológicos tales como anticuerpos monoclonales, en los que se incluyen Herceptina™ contra el antígeno HER2, Avastin™ contra VEGF, anticuerpos al receptor de EGF tales como Erbitux® o un anticuerpo monoclonal anti-FGF, también como fármacos anti-angiogénicos de molécula pequeña o antagonistas de receptor de EGF tales como Iressa® y Tarceva®. Además, el anticuerpo monoclonal puede ser administrado junto con cualquier forma de terapia de radiación en las que se incluyen radiación de haz externo, terapia de radiación de intensidad modulada (IMRT) y cualquier forma de radiocirugía en las que se incluyen Gamma Knife, Cyberknife, Linac y radiación intersticial (por ejemplo, semillas radioactivas implantadas, globo de GliaSite).

Aunque en una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal no está enlazado o conjugado a algún otro agente, en otras modalidades el anticuerpo monoclonal puede ser conjugado a un radioisótopo, fármaco o profármaco quimioterapéutico o una toxina. Por ejemplo, puede ser enlazado a un radioisótopo que emite rayos alfa, beta y/o gamma, por ejemplo, ⁹⁰Y, isótopos de yodo tales como ¹³¹I o isótopos de bismuto tales como ²¹²Bi o ²¹⁴Bi; a una toxina de proteína de planta o bacteriana tal como exotoxina de ricina o pseudomonas

o sus fragmentos tales como PE40; a una toxina de molécula pequeña tales como compuestos relacionados con o derivados de calicheamicina, auristatina o maitansina; o a un fármaco quimioterapéutico tal como doxorubina o cualquiera de los otros
5 fármaco quimioterapéuticos enlistados anteriores. Métodos de enlace de tales agentes a un anticuerpo monoclonal son bien conocidos para aquellos experimentados en el arte.

La administración sistémica de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-HGF
10 neutralizante tal como L2G7 o sus variantes, opcionalmente más otro tratamiento (por ejemplo, quimioterapia o terapia de radiación), puede incrementar la supervivencia libre de avance medio o tiempo de supervivencia global de pacientes con ciertos tumores de cerebro (por ejemplo, glioblastomas) mediante por lo
15 menos 30% o 40%, pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o aún 100% o más largo, en comparación con un régimen de control sin la administración del anticuerpo monoclonal. Si la administración del anticuerpo monoclonal anti-HGF es acompañada por otro tratamiento tal como quimioterapia o radiación, el otro
20 tratamiento es también incluido en el régimen de control. Si el anticuerpo monoclonal anti-HGF mAb es administrado sin otro tratamiento, el régimen de control es un placebo o tratamiento no específico. Además o alternativamente, la administración sistémica de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un
25 anticuerpo monoclonal anti-HGF neutralizante tal como L2G7 o

sus variantes, más otro tratamiento (por ejemplo, quimioterapia o terapia de radiación), puede incrementar la proporción de respuesta completa (regresión completa del tumor, esto es remisión), proporción de respuesta parcial (una respuesta
5 parcial en un paciente significa encogimiento parcial del tamaño del tumor, por ejemplo por al menos 30% o 50%) o proporción de respuesta objetivo (completa + parcial) de pacientes con ciertos tumores de cerebro por lo menos 30% o 40% de los pacientes pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o aún 90%
10 o más en comparación con un régimen de control sin la administración del anticuerpo monoclonal como se describe anteriormente. Los cambios en el tamaño de un tumor en respuesta al tratamiento pueden ser determinados mediante MRI, exploración de CT y los semejantes.

15 Similarmente, cuando son administrados sistémicamente a animales (por ejemplo ratones inmunodeficientes tales como ratones desnudos o ratones SCID) que llevan xenoinjertos intracraneales de tumores de glioma humanos, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2 a continuación, el anticuerpo
20 monoclonal anti-HGF neutralizante o anticuerpo monoclonal anti-FGF u otro anticuerpo monoclonal prolongar la supervivencia media de los animales por al menos 25 ó 30 ó 40 días, pero preferiblemente 50, 60 ó 70 días o aún más tiempo y tal extensión será estadísticamente significativa. Esto será cierto
25 aún si el inicio del tratamiento es retardado hasta por lo

menos 5 ó 18 días o más después de la implantación de la célula de tumor. Además, tal tratamiento en promedio encogerá los tumores por el menos 25% pero preferiblemente 50% o aún 75%; y el volumen de tumor promedio en los animales tratados con el anticuerpo monoclonal será menor de 50% o aún 25% o 10% del volumen de tumor promedio en los animales tratados por control. El tamaño de tumor será comúnmente medido 21 ó 29 días después del implante de célula de tumor.

Comúnmente, en un estudio clínico (por ejemplo, estudio de fase II, fase II/III o fase III), los incrementos mencionados anteriormente en proporción de sobrevivencia y/o respuesta libre de avance medio de los pacientes tratados mediante la administración de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-HGF, opcionalmente más otro tratamiento en relación con los paciente que reciben un régimen de control sin el anticuerpo, son estadísticamente significativas, por ejemplo a la $p = 0.05$ ó 0.01 o aún a nivel de 0.001 . Las proporciones respuesta completa y parcial son determinadas mediante criterios objetivos usados comúnmente en pruebas clínicas para cáncer, por ejemplo como se enlista o está aceptado por el Instituto Nacional de Cáncer y/o Administración de Alimentos y Fármacos.

EJEMPLOS

1. Generación y de propiedades in vitro de anticuerpos m anti-HGF

El desarrollo de un anticuerpo monoclonal anti-HGF
5 plenamente neutralizante L2G7 se ha descrito en la solicitud de
patente estadounidense publicada No. US 2005/0019327 A1, que es
incorporada en la presente por referencia. En resumen, ratones
Balb/c fueron inmunizados extensamente con HGF humano
recombinante mediante inyecciones en cuartos traseros y se
10 generaron hibridomas a partir de ellos mediante medios
convencionales. Proteínas de fusión quiméricas que consisten de
HGF fusionadas a péptido de Flag (HGF-Flag) y el dominio
extracelular de Met fusionado a la región Fc de IgG1 humano
(Met-Fc), fueron producidas mediante técnicas recombinantes
15 convencionales y usadas para determinar la habilidad de los
anticuerpos monoclonales anti-HGF para inhibir el enlace de HGF
a su receptor de Met. La figura 1a demuestra la habilidad de
tres anticuerpos monoclonales anti-HGF separados, cada uno
reconocen un epítipo diferente para capturar HGF en solución.
20 Aunque el anticuerpo monoclonal IgG2a L2G7 tiene afinidad
intermedia por HGF tal como se juzga por la habilidad de
enlace, es el único anticuerpo monoclonal identificado que
bloque completamente el enlace de HGF-Flag a Met-Fc en un ELISA
(figura 1b). El anticuerpo monoclonal L2G7 es específico por

HGF, como se demuestra al no enlazarse a otros factores de crecimiento tales como VEGF, FGF o EGF.

La habilidad del anticuerpo monoclonal L2G7 para bloquear el enlace de HGF a Met sugiere que inhibiría todas las respuestas celulares inducidas por HGF, pero esta suposición requiere verificación debido a que las subunidades α y β de HGF moderan actividades diferentes (Lokker et al., EMBO J. 11: 2503, 1992; Hartmann et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 89: 11574, 1992). Una bioactividad importante de HGF moderada por medio de su subunidad α , del cual su nombre alternativo "factor de dispersión" se deriva, es la capacidad para inducir dispersión celular. La figura 2a muestra que L2G7 es apto para inhibir completamente la dispersión inducida por HGF de células epiteliales MDCK, un análisis biológico usado ampliamente para cuantificar la actividad de dispersión de HGF. Una actividad biológica clave de HGF moderada por medio de su subunidad β es mitogénesis de ciertos tipos de células. La figura 2b muestra que L2G7 a una proporción molar 1:1 de anticuerpo monoclonal a HGF inhibe completamente la incorporación de 3H-timidina inducida por HGF en células epiteliales de pulmón de mink Mv 1 Lu. Así, el anticuerpo monoclonal L2G7 bloquea las actividades biológicas inducidas por HGF atribuibles a ambas de las subunidades de HGF α y β .

La angiogénesis es requerida para el crecimiento de tumores sólidos. HGF es un factor angiogénico potente (Grant et

al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 90: 1937, 1993) y los niveles de tumor de HGF se correlacionan con la densidad vascular de malignidades humanas en las que se incluyen gliomas (Schmidt, et al. Int. J. Cancer 84: 10, 1999). HGF puede también
5 estimular la producción de otros factores angiogénicos tales como VEGF y puede potenciar la angiogénesis inducida por VEGF (Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001). Dos etapas prematuras involucradas en la angiogénesis son la proliferación de célula endotelial y formación de túbulo. El efecto de L2G7
10 sobre la proliferación inducida por HGF de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y formación de túbulos semejantes a bazo en geles de colágeno tridimensional fue por consiguiente determinada. La estimulación de proliferación de HUVEC mediante HGF (50 ng/ml, 72 horas) fue completamente
15 inhibida por L2G7 a una proporción molar de 1.5:1 de anticuerpo monoclonal a HGF (figura 2c). HUVEC suspendidos en geles de colágeno 3-D desarrollaron una red de túbulo de ramificación interconectada después de estimulación con HGF (200 ng/ml, 48 horas), en tanto que las células tratadas con HGF más L2G7
20 mostraron poca o ninguna de tal formación de túbulo (figura 2d). De aquí, L2G7 bloquea los aspectos proliferativos inducidos para HGF y aspectos morfogénicos de la angiogénesis.

HGF protege a las células de tumor de la muerte apoptótica inducida por numerosas modalidades en las que se
25 incluyen agentes dañinos de ADN usados común en terapia de

cáncer (Bowers et al. Cancer Res. 60: 4277, 2000; Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005). La mayoría de células de glioma malignos humanos expresan el receptor de muerte FAS, haciéndolas susceptibles a apoptosis inducida por anticuerpo anti-FAS in vitro (Weller et al. J. Clin. Invest. 94: 954, 1994). Así, los efectos de L2G7 sobre la citoprotección moderada por HGF de células de glioma U87 tratadas con anticuerpo monoclonal anti-FAS apoptótico CH-11 fue determinado. La viabilidad de célula de U87 después de tratamiento con CH-11 (24 horas) fue reducida a ~45% de aquella en controles sin tratar, un efecto que fue completamente invertido mediante pre-incubación de células con HGF de un anticuerpo de control de isotipo irrelevante pero no por HGF en presencia de L2G7 (figura 2e).

2. Efectos de un anticuerpo monoclonal anti-HGF en modelos de tumor de xenoinjerto de glioma

La habilidad de L2G7 para bloquear múltiples actividades promotoras de tumor de HGF sugirieron que este anticuerpo monoclonal tendría actividad anti-tumor contra por lo menos tumores humanos HGF+/Met+. La mayoría de gliomas parecen expresar Met y HGF (Rosen et al. Int. J. Cancer 67: 248, 1996). Para las líneas celulares de glioma U87 y U118, la expresión de Met fue confirmada mediante análisis citométrico de flujo y ~20-35 ng/ml HGF en sobrenadantes de cultivos de confluente de 7 días utilizando un ELISA HGF-específico fue

detectado. El efecto anti-tumor de L2G7 en modelos de ratón desnudos de xenoinjertos subcutáneos U118 y U87 preestablecidos fue determinado. L2G7 fue administrado i.p. dos veces a la semana después que los tamaños de tumor habían llegado a ~50 mm³ como se describe (Kim et al., Nature 362: 841, 1993, que es incorporado en la presente por referencia). A 100 µg (~5 mg/Kg) por inyección, L2G7 inhibió completamente el crecimiento de tumores U118 (figura 3a). En modelo de xenoinjerto U87, ya sea 50 µg o 100 µg de L2G7 por inyección no solamente inhibió el crecimiento del tumor sino provocó realmente regresión del tumor (figura 3b). El anticuerpo monoclonal de control (100 µg por inyección) solamente inhibió ligeramente el crecimiento de tumor en comparación con el control de PBS. L2G7 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumor de glioma U251, que expresa Met pero no segrega HGF. Estos resultados in vivo demuestran que L2G7 como un solo agente impide el crecimiento de tumor al bloquear específicamente la actividad de HGF.

Enseguida, la eficacia de L2G7 fue examinada en ratones que llevan xenoinjertos de glioma U87 intracraneales preestablecidos. Los ratones fueron implantados con células de glioma maligno humano U87 (100,000 células/animal) mediante inyección estereotáctica al caudato derecho/putamen. L2G7 (100 µg/inyección, i.p., dos veces a la semana) administrado desde el día de post-implante 5 al día 52 prolongó significativamente

la sobrevivencia del animal (figura 3c). En ratones de control, la supervivencia media fue de 39 días y todos los ratones murieron de tumores progresivos por el día 41. En contraste, todos los ratones tratados con L2G7 sobrevivieron al 70 y 80% sobrevivieron al día 90, siete semanas después de cese del tratamiento del anticuerpo monoclonal (figura 3c). En los ratones sacrificados, en el día 21 después de tres dosis de L2G7, los tumores de control fueron más de 10 veces más grandes que los tumores tratados con L2G7 ($6.6 \pm 2.7 \text{ mm}^3$ vs. $0.54 \pm 0.17 \text{ mm}^3$) (figura 3d).

Para probar la eficacia del anticuerpo monoclonal aún bajo condiciones más severas, en un inicio de experimento similar de tratamiento de L2G7 fue retardado hasta el día 18. Un subconjunto de ratones ($n = 5$ por grupo) fue sacrificado prematuramente en el curso del tratamiento y los volúmenes de tumor fueron cuantificados al medir las áreas de sección transversal de tumor de secciones de cerebro teñidas con H&E utilizando análisis de imagen auxiliada por computadora. L2G7 indujo regresión de tumor sustancial (figura 3e,f). Específicamente, los volúmenes de tumor de pre-tratamiento en el día 18 fueron $26.7 \pm 2.5 \text{ mm}^3$ (intervalo $19.5\text{-}54 \text{ mm}^3$, media 27.9 mm^3). En el día 29, después de 3 dosis de L2G7, los tumores fueron de solamente $11.7 \pm 5.0 \text{ mm}^3$ (intervalo $0\text{-}26.2 \text{ mm}^3$, media 7.5 mm^3), de tal manera que los tumores habían realmente cedido o encogido de tamaño en promedio por 50% o

más. Los volúmenes de tumor en el día 29 de ratones tratados con anticuerpo monoclonal de control de isotipo apareado fueron de $134.3 \pm 22.0 \text{ mm}^3$ (intervalo 71.2-196.8 mm^3 , media 128 mm^3). De aquí, los tumores tratados con el anticuerpo monoclonal de control crecieron casi 5 veces con un volumen medio 12 veces más grande que los tumores tratados con L2G7. En los ratones que no fueron sacrificados ($n = 10$ por grupo), la supervivencia media en los ratones de control fue de 32 días y todos murieron al día 42, en tanto que ninguno de los ratones tratados con L2G7 murieron hasta el día 46 y L2G7 extendió la supervivencia media al día 61. Así, L2G7 indujo la regresión de tumor en ratones con cargas de tumor muy altas.

Un análisis más detallado de secciones histológicas de tumores intracraneales fue efectuado para investigar mecanismos potenciales de los efectos anti-tumor de L2G7 (figura 4). Enseguida de tres dosis de L2G7, la proliferación de célula de tumor (índice Ki-67) y angiogénesis (densidad de vasos, esto es, área de vasos de tumor teñidos con anti-laminina como por ciento de área de tumor) fue reducida por 51% y 62%, respectivamente, en tanto que el índice apoptótico de células de tumor cuantificadas por el número de células positivas de caspasa-3 activadas fue incrementada 6 veces. La regresión de tumor pronunciada que ocurrió pronto después del inicio de terapia de L2G7 es indicadora de una respuesta de muestra celular similar a aquella observada en xenoinjertos

Colo 205 de tumor de colon humano tratados con un anticuerpo m receptor 4 anti-muerte (TRAIL1) agonista (Chuntharapai et al. J. Immunol. 166: 4891, 2001).

Los resultados reportados en la presente son ejemplos
5 sorprendentes de respuestas de tumor de cerebro de un anticuerpo monoclonal no enlazado a una toxina o radionúclido. Como comparación, en modelos de xenoinjerto subcutáneos el anticuerpo monoclonal murino anti-VEGF A4.6.1, que fue más tarde inmunizado para crear el fármaco Avastin®, inhibió el
10 crecimiento del glioma humano G55 por solamente ~50-60% (Kim et al., Nature 362: 841, 1993), contrastó con la inhibición de crecimiento esencialmente completa de los gliomas U87 y U118 por el anticuerpo monoclonal L2G7. En un modelo de tumor intracraneal ortotópico, el anticuerpo monoclonal anti-VEGF
15 sistémico administrado simultáneamente con implante de célula de glioma G55 prolongó la supervivencia del animal por solamente 2-3 semanas (Rubenstein et al. Neoplasia 2: 306, 2000). Similarmente, la administración sistémica de un anticuerpo monoclonal a una variante del receptor de EGF
20 prolongó la supervivencia media de ratones con xenoinjertos intracraneales de células de glioma transfectadas con el receptor de EGF variante, en general modestamente (de 13 a 21 días o de 13 a 19 días, pero no en caso de 19 días a 58 días; Mishima et al., Cancer Res. 61: 4349, 2001). Sin embargo, estos
25 efectos modestos fueron obtenidos cuando la administración del

anticuerpo monoclonal comenzó simultáneamente con o brevemente después de la implantación del xenoinjerto y de aquí fue provocada probablemente, por lo menos en parte, al retardar el inicio de la vascularización del xenoinjerto, un evento que no puede ser apuntado en pacientes con tumores de cerebro preexistentes. En contraste, la administración sistémica del anticuerpo monoclonal anti-HGF L2G7 prolongó la sobrevivencia y provocó la regresión del tumor aún cuando es administrado el día 5 o aún día 18 después del implante cuando los tumores estaban bien establecidos y así corresponde a la situación en pacientes humanos.

Los efectos anti-tumor pronunciados del anticuerpo monoclonal L2G7 son probablemente debidos a la propiedades multifuncionales únicas de su HGF objetivo molecular, esto es, mitogénico, angiogénico y citoprotector (Birchmeier et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 915, 2003; Trusolino et al. Nat. Rev. Cancer 4: 289, 2002). La habilidad de L2G7 para inducir la regresión de glioma implica una respuesta de muerte celular que podría resultar en la apoptosis moderada por Fas, que es bloqueada el enlace de HGF a Met (Wang et al. Cell. 9: 411, 2002) o de la desactivación de las rutas citoprotectoras inducidas por HGF que involucran los intermediarios de fosfatidil inositol 3-cinasa, Akt y NF-kappaB (Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005). La habilidad de L2G7 para bloquear los efectos citoprotectores y angiogénicos de HGF predice que

L2G7 administrado sistémicamente potencia modalidades citotóxicas tales como radiación y y quimioterapia usada actualmente para tratar tumores de cerebro malignos.

Aunque la invención se ha sido descrito con
5 referencia a las modalidades actualmente preferidas, se debe entender que varias modificaciones se pueden efectuar sin desviarse de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente son incorporadas por referencia
10 en su totalidad para todos los propósitos a la misma extensión como si cada publicación individual, patente y solicitud de patente fuera indicada específica e individualmente para ser incorporada por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de un tumor de cerebro en un paciente, caracterizado porque comprende administrar un anticuerpo monoclonal (mAb) a un paciente que
5 tiene un tumor de cerebro y mediante esto tratar el tumor de cerebro.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es quimérico, humanizado o humano.

10 3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal anti-HGF neutralizante.

4. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo
15 monoclonal L2G7 humanizado.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es administrado intravenosamente.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1,
20 caracterizado porque el tumor del cerebro es un glioma.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el tumor de cerebro es un glioblastoma.

8. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el paciente es humano.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el paciente es también tratado con terapia de radiación.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es administrado junto con uno o más otros fármacos anti-cáncer activos.

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal se enlaza a un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste de:
10 factor de crecimiento de célula endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de nervio (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), NT-3, factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa (TGF- α), TGF- β 1, TGF- β 2, factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), factor de crecimiento
15 epidérmico (EGF), heregulina, epiregulina, enfiregulina, neuregulina (NRG)-1alfa (NRG-1 α), NRG-1 β , NRG-2 α , NRG-2 β , NRG-3, NRG-4, factor de crecimiento semejante a insulina (IGF)-1 (IGF-1), IGF-2, factor de crecimiento de fibroblasto ácido (FGF) (FGF-1), FGF básico (FGF-2) y FGF-n, en donde n es
20 cualquier número de 3 a 23.

12. Un método para provocar la regresión de un tumor de cerebro en un paciente, caracterizado porque comprende administrar sistémicamente un anticuerpo monoclonal (mAb) a un paciente que tiene un tumor de cerebro y provocar mediante esto
25 regresión del tumor de cerebro.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es quimérico, humanizado o humano.

14. El método de conformidad con la reivindicación 5 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal anti-HGF neutralizante.

15. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal L2G7 humanizado.

10 16. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es administrado intravenosamente.

17. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el tumor del cerebro es un glioma.

15 18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el tumor de cerebro es un glioblastoma.

19. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el paciente es humano.

20 20. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el paciente es también tratado con terapia de radiación.

21. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es

administrado junto con uno o más otros fármacos anti-cáncer activos.

22. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal se enlaza a un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste de: factor de crecimiento de célula endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de nervio (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), NT-3, factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa (TGF- α), TGF- β 1, TGF- β 2, factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), heregulina, epiregulina, enfiregulina, neuregulina (NRG)-1alfa (NRG-1 α), NRG-1 β , NRG-2 α , NRG-2 β , NRG-3, NRG-4, factor de crecimiento semejante a insulina (IGF)-1 (IGF-1), IGF-2, factor de crecimiento de fibroblasto ácido (FGF) (FGF-1), FGF básico (FGF-2) y FGF-n, en donde n es cualquier número de 3 a 23.

23. El anticuerpo anti-HGF neutralizante, caracterizado porque se usa en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un tumor de cerebro mediante administración sistémica.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es concerniente con un método para el tratamiento de un cerebro de tumor en un paciente, que comprende administrar sistémicamente un anticuerpo monoclonal.

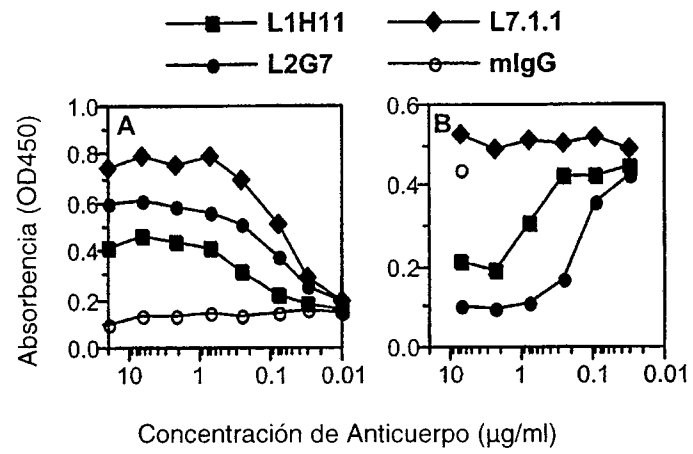


Fig. 1

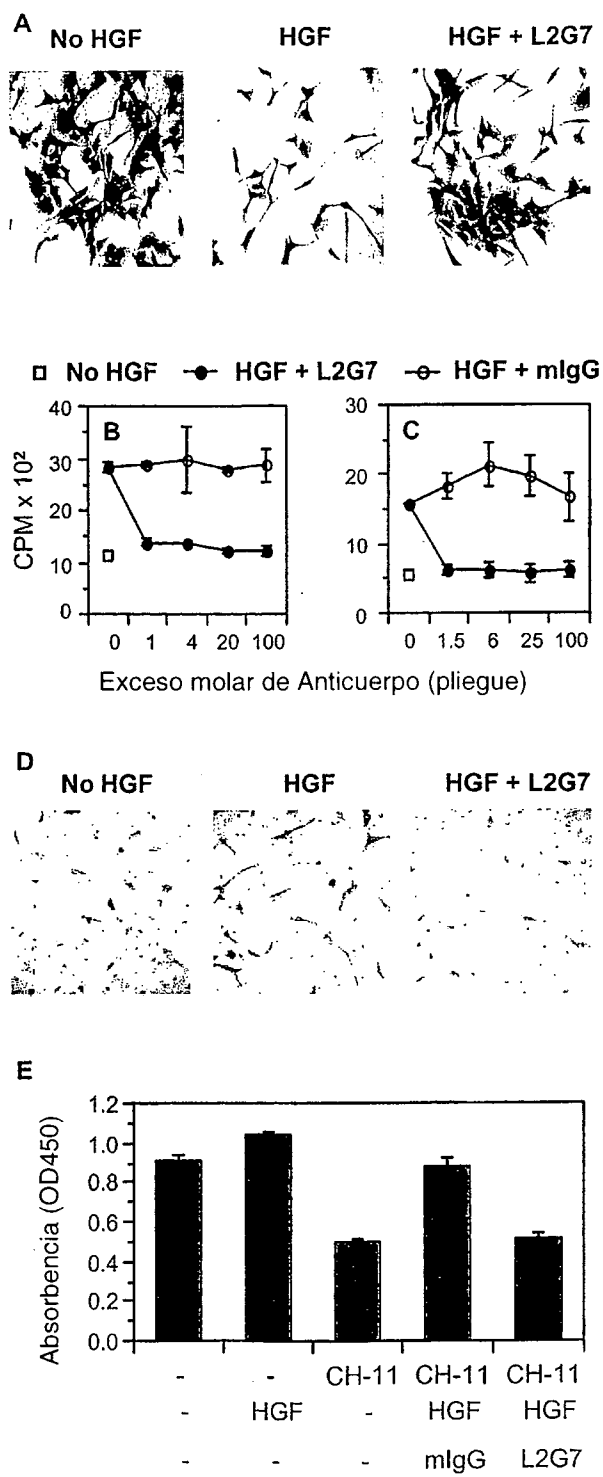


Fig. 2

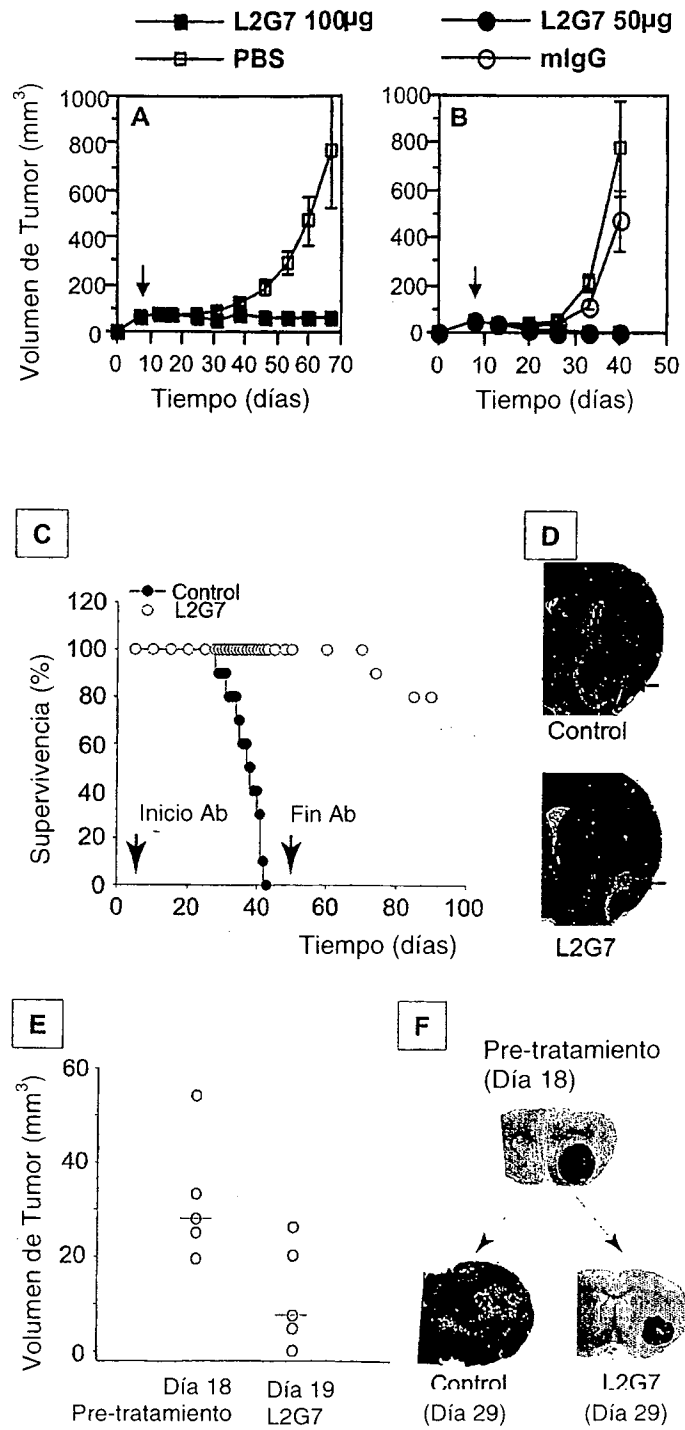


Fig. 3

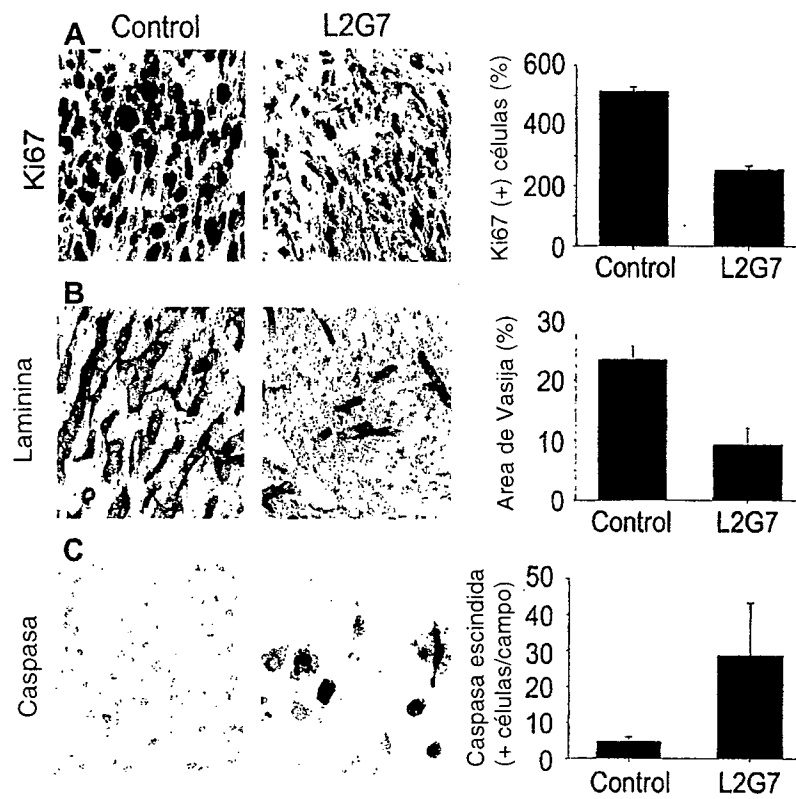


Fig. 4

RKC

UPP)

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

LIEBESCHUETZ, Joe
TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP
Two Embarcadero Center
8th Floor
San Francisco, California 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

022382-00022 OPC

Date of mailing (day/month/year) 29 August 2006 (29.08.2006)	
Applicant's or agent's file reference 22382-2-PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/021293 ✓	International filing date (day/month/year) 01 June 2006 (01.06.2006) ✓
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 02 June 2005 (02.06.2005) ✓
Applicant GALAXY BIOTECH, LLC et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
✓ 02 June 2005 (02.06.2005)	60/687,118	US	15 August 2006 (15.08.2006)
✓ 15 December 2005 (15.12.2005)	60/751,092	US	15 August 2006 (15.08.2006)

Priority Doc
UnDocketed By T3S

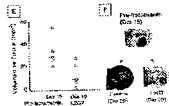
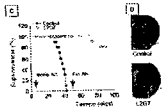
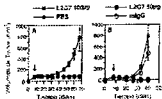
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Philippe Becamel Facsimile No. +41 22 338 70 90 Telephone No. +41 22 338 99 78
---	---

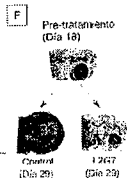
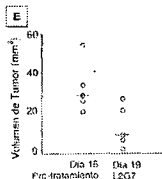
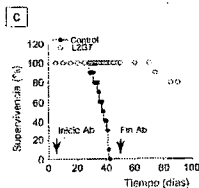
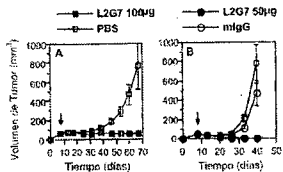
Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (October 2005)

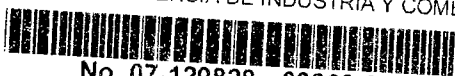
I/CYTNR4H90

83





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-129828- -00000-0000

Fecha: 2007-12-07 15:56:40 Dep: 2020 NULCREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASLNACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folia: 84



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- Representación gráfica del esquema trazado ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M Nova Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52-20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia