



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 845**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03731327 .7**
96 Fecha de presentación : **12.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1532174**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Anticuerpo contra el receptor de IGF-I.**

30 Prioridad: **14.06.2002 US 170390**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

73 Titular/es: **IMMUNOGEN, Inc.**
830 Winter Street
Waltham, Massachusetts 02451, US

72 Inventor/es: **Singh, Rajeeva;**
Tavares, Daniel, J. y
Dagdigian, Nancy, E.

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 365 845 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra el receptor del IGF-I

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I humano (receptor del IGF-I). Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos contra el receptor del IGF-I que inhibe las funciones celulares del receptor del IGF-I. Aún más particularmente, la invención se refiere a los anticuerpos contra el receptor del IGF-I que antagonizan con los efectos de IGF-I, IGF-II y suero sobre el crecimiento y supervivencia de las células tumorales y que están sustancialmente desprovistos de actividad agonista. La invención también se refiere a fragmentos de dichos anticuerpos, versiones de dichos anticuerpos humanizadas y con la superficie remodelada, conjugados de dichos anticuerpos y los usos de los mismos para aplicaciones diagnósticas, de investigación y terapéuticas. La invención además se refiere a anticuerpos mejorados o fragmentos de los mismos que están formados por los anticuerpos descritos anteriormente y por fragmentos de los mismos. En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica los anticuerpos o los fragmentos de los mismos, y a los vectores que comprenden los polinucleótidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** El receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I (receptor del IGF-I o IGF-IR) es una proteína heterotetramérica transmembranaria, que tiene dos cadenas α extracelulares y dos cadenas β que atraviesan la membrana en una configuración β - α - α - β unida por puentes disulfuros. La fijación de los ligandos, que son el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y el factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II), en el dominio extracelular del receptor del IGF-I activa su dominio tirosina cinasa intracelular, lo que da lugar a la autofosforilación del receptor y la fosforilación del sustrato. El receptor del IGF-I es homólogo al receptor de la insulina, que tiene una elevada similitud de secuencia del 84% en el dominio tirosina cinasa de la cadena β y una baja similitud de secuencia del 48% en el dominio extracelular rico en cisteínas de la cadena α (Ulrich, A. et al., 1986, EMBO J, 5, 2503-2512; Fujita-Yamaguchi, Y. et al., 1986, J. Biol. Chem., 261, 16727-16731; LeRoith, D. et al., 1995, Endocrine Reviews, 16, 143-163). El receptor del IGF-I y sus ligandos (IGF-I e IGF-II) desempeñan funciones importantes en muchos procesos fisiológicos, que incluyen el crecimiento y el desarrollo durante la embriogénesis, el metabolismo, la proliferación celular y la diferenciación celular en los adultos (LeRoith, D., 2000, Endocrinology, 141, 1287-1288; LeRoith, D., 1997, New England J. Med., 336, 633-640).

20 **[0003]** Tanto el IGF-I como el IGF-II funcionan como hormonas endocrinas en la sangre, donde están presentes predominantemente en complejos con proteínas de fijación al IGF, y como factores de crecimiento paracrino y autocrino que se producen localmente (Humbel, R. E., 1990, Eur. J. Biochem., 190, 445-462; Cohick, W. S. y Clemmons, D. R., 1993, Annu. Rev. Physiol. 55, 131-153).

25 **[0004]** Se ha propuesto que el receptor del IGF-I promueve el crecimiento, la transformación y la supervivencia de las células tumorales (Baserga, R. et al., 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332, F105-F126; Blakesley, V. A. et al., 1997, Journal of Endocrinology, 152, 339-344; Kaleko, M., Rutter, W. J., y Miller, A. D. 1990, Mol. Cell. Biol., 10, 464-473). Por lo tanto, se conocen varios tipos de tumores que expresan una cantidad mayor de lo normal del receptor del IGF-I, que incluyen el cáncer de mama, el cáncer de colon, el carcinoma de ovario, el sarcoma sinovial y el cáncer de páncreas (Khandwala, H. M. et al., 2000, Endocrine Reviews, 21, 215-244; Werner, H. y LeRoith, D., 1996, Adv. Cancer Res., 68, 183-223; Happerfield, L. C. et al., 1997, J. Pathol., 183, 412-417; Frier, S. et al., 1999, Gut, 44, 704-708; van Dam, P. A. et al., 1994, J. Clin. Pathol., 47, 914-919; Xie, Y. et al., 1999, Cancer Res., 59, 3588-3591; Bergmann, U. et al., 1995, Cancer Res., 55, 2007-2011). Se ha demostrado que, in vitro, el IGF-I y el IGF-II son potentes mitógenos para varias estirpes celulares tumorales humanas, tales como el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el osteosarcoma y el cáncer cervical (Ankrapp, D. P. y Bevan, D. R., 1993, Cancer Res., 53, 3399-3404; Cullen, K. J., 1990, Cancer Res., 50, 48-53; Hermanto, U. et al., 2000, Cell Growth & Differentiation, 11, 655-664; Guo, Y. S. et al., 1995, J. Am. Coll. Surg., 181, 145-154; Kappel, C. C. et al., 1994, Cancer Res., 54, 2803-2807; Steller, M. A. et al., 1996, Cancer Res., 56, 1761-1765). Varios de estos tumores y estirpes celulares tumorales también expresan una gran cantidad de IGF-I o IGF-II, que pueden estimular su crecimiento de un modo autocrino y paracrino (Quinn, K. A. et al., 1996, J. Biol. Chem., 271, 11477-11483).

30 **[0005]** Los estudios epidemiológicos han demostrado que una elevada concentración del IGF-I en plasma (y la menor cantidad de la proteína 3 de fijación al IGF) se correlaciona con un aumento del riesgo de cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de mama (Chan, J. M. et al., 1998, Science, 279, 563-566; Wolk, A. et al., 1998, J. Natl. Cancer Inst., 90, 911-915; Ma, J. et al., 1999, J. Natl. Cancer Inst., 91, 620-625; Yu, H. et al., 1999, J. Natl. Cancer Inst., 91, 151-156; Hankinson, S. E. et al., 1998, Lancet, 351, 1393-1396). Para prevenir el cáncer se han sugerido estrategias de disminución de la concentración del IGF-I en el plasma o de inhibición la actividad del receptor del IGF-I (Wu, Y. et al., 2002, Cancer Res., 62, 1030-1035; Grimberg, A y Cohen P., 2000, J. Cell. Physiol., 183, 1-9).

5 **[0006]** El receptor del IGF-I protege las células tumorales de la apoptosis ocasionada por la carencia de factores de crecimiento, independencia de la fijación al sustrato, o tratamiento con fármacos citotóxicos (Navarro, M. y Baserga, R., 2001, *Endocrinology*, 142, 1073-1081; Baserga, R. et al., 1997, *Biochem. Biophys. Acta*, 1332, F105-F126). Se han identificado los dominios del receptor del IGF-I que son críticos para sus actividades mitógenas, transformantes y antiapoptósicas mediante análisis mutacional.

10 **[0007]** Por ejemplo, el resto de tirosina 1251 del receptor del IGF-I se ha identificado como fundamental para las actividades antiapoptósicas y de transformación, pero no para su actividad mitógena (O'Connor, R. et al., 1997, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 427-435; Miura, M. et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 22639-22644). La vía de señalización intracelular del receptor del IGF-I activado por ligando implica la fosforilación de los restos de tirosina de los sustratos del receptor de la insulina (IRS-1 e IRS-2), que reclutan la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3-K) a la membrana. Los productos fosfolipídicos fijados a la membrana de la PI-3-K activan una serina/treonina cinasa Akt, cuyos sustratos incluyen la proteína proapoptósica BAD, que se fosforila y se inactiva (Datta, S. R., Brunet, A. y Greenberg, M. E., 1999, *Genes & Development*, 13, 2905-2927; Kulik, G., Klippel, A. y Weber, M. J., 1997, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 1595, -1606). La señalización mitógena del receptor del IGF-I en las células del cáncer de mama humano MCF-7 requiere la PI-3-K y es independiente de la proteína cinasa activada por mitógenos, mientras que la señalización de supervivencia en las células del feocromocitoma de rata diferenciado PC12 requiere tanto la vía de la PI-3-K como la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (Dufourny, B. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 31163-31171; Parrizas, M., Saltiel, A. R. y LeRoith, D., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 154-161).

20 **[0008]** Se ha demostrado que la disminución de la cantidad de receptor del IGF-I mediante estrategias antisentido reduce la capacidad neoplásica de varias estirpes celulares tumorales in vivo e in vitro, tales como melanoma, carcinoma de pulmón, cáncer de ovario, glioblastoma, neuroblastoma y rabdomiosarcoma (Resnicoff, M. et al., 1994, *Cancer Res.*, 54, 4848-4850; Lee, C.-T. et al., 1996, *Cancer Res.*, 56, 3038-3041; Muller, M. et al., 1998, *Int. J. Cancer*, 77, 567-571; Trojan, J. et al., 1993, *Science*, 259, 94-97; Liu, X. et al., 1998, *Cancer Res.*, 58, 5432-5438; Shapiro, D. N. et al., 1994, *J. Clin. Invest.*, 94, 1235-1242). Asimismo, se ha descrito que un mutante negativo dominante del receptor del IGF-I reduce la capacidad neoplásica in vivo y el crecimiento in vitro de las células Rat-1 transformadas que sobreexpresan el receptor del IGF-I (Prager, D. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 2181-2185).

30 **[0009]** Las células tumorales que expresan un antisentido del ARNm del receptor del IGF-I sufren una apoptosis masiva cuando se inyectan en animales en cámaras de biodifusión. Esta observación convierte al receptor del IGF-I en una diana terapéutica atractiva, basándose en la hipótesis de que las células tumorales son más susceptibles a la apoptosis por inhibición del receptor del IGF-I que las células normales (Resnicoff, M. et al., 1995, *Cancer Res.*, 55, 2463-2469; Baserga, R., 1995, *Cancer Res.*, 55, 249-252).

35 **[0010]** Otra estrategia para inhibir el funcionamiento del receptor del IGF-I en las células tumorales ha sido utilizar anticuerpos contra el receptor del IGF-I que se unen a los dominios extracelulares del receptor del IGF-I e inhiben su activación. Se han descrito varios intentos para desarrollar anticuerpos monoclonales de ratón contra el receptor del IGF-I, de los cuales dos anticuerpos inhibidores, el IR3 y el 1H7, están disponibles y se ha descrito su utilización en varios estudios del receptor del IGF-I.

40 **[0011]** El anticuerpo IR3 se obtuvo utilizando una preparación placentaria del receptor de la insulina parcialmente purificado para inmunizar ratones, que produjeron un anticuerpo, el IR1, que era selectivo para la fijación al receptor de la insulina, y dos anticuerpos, el IR2 y el IR3, que inmunoprecipitaban preferentemente el receptor del IGF-I (receptor de la somatomedina-C), pero también una débil inmunoprecipitación del receptor de la insulina (Kull, F. C. et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 258, 6561-6566).

45 **[0012]** El anticuerpo 1H7 se obtuvo mediante la inmunización de ratones con una preparación placentaria purificada del receptor del IGF-I, lo que produjo el anticuerpo inhibidor 1H7 además de tres anticuerpos estimuladores (Li, S.-L. et al., 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 92-98; Xiong, L. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5356-5360).

50 **[0013]** En otro informe, se obtuvo un grupo de anticuerpos monoclonales de ratón específicos contra el receptor del IGF-I humano mediante la inmunización de los ratones con células 3T3 transfectadas que expresaban una gran cantidad del receptor del IGF-I, que se clasificaron en siete grupos mediante estudios de fijación competitiva y por su inhibición o estimulación de la fijación del IGF-I a células 3T3 transfectadas (Soos, M. A. et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 12955-12963).

55 **[0014]** Por lo tanto, aunque el anticuerpo IR3 es el anticuerpo inhibidor más utilizado para los estudios del receptor del IGF-I in vitro, tiene el inconveniente de que muestra una actividad agonista en las células 3T3 y CHO transfectadas que expresan el receptor del IGF-I humano (Kato, H. et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 2655-2661; Steele-Perkins, G. y Roth, R. A., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 1244-1251). De igual forma, entre el grupo de anticuerpos obtenidos por Soos et al., los anticuerpos con mayor actividad inhibitoria, 24-57 y 24-60, también mostraron una actividad agonista en las células 3T3 transfectadas (Soos, M. A. et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 12955-12963). Aunque se describe que el anticuerpo IR3 inhibe la fijación del IGF-I (pero no del IGF-II) a los

receptores que se expresan en las células intactas y después de la solubilización, se ha demostrado que inhibe la capacidad para estimular la síntesis de ADN en las células in vitro que tienen tanto IGF-I como IGF-II (Steele-Perkins, G. y Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251). A partir de las construcciones quiméricas del receptor de IGF-I-insulina se ha inferido que el epítipo de fijación del anticuerpo IR3 es la región 223-274 del receptor del IGF-I (Gustafson, T. A. y Rutter, W. J., 1990, J. Biol. Chem., 265, 18663-18667; Soos, M. A. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963).

[0015] La línea celular del cáncer de mama humano MCF-7 se utiliza típicamente como una estirpe celular modelo para demostrar la respuesta de crecimiento del IGF-I y del IGF-II in vitro (Dufourny, B. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171). En las células MCF-7, el anticuerpo IR3 bloquea de forma incompleta, aproximadamente el 80%, el efecto estimulador del IGF-I y del IGF-II añadidos exógenamente en condiciones libres de suero. Igualmente, el anticuerpo IR3 no inhibe significativamente (menos del 25%) el crecimiento de las células MCF-7 en suero al 10% (Cullen, K. J. et al., 1990, Cancer Res., 50, 48-53). Que el anticuerpo IR3 inhiba débilmente in vitro el crecimiento de las células MCF-7 estimulado por el suero podría estar relacionado con los resultados de un estudio in vivo en el que el tratamiento con el anticuerpo IR3 no inhibió significativamente el crecimiento de un xenoinjerto de MCF-7 en ratones desnudos (Arteaga, C. L. et al., 1989, J. Clin. Invest., 84, 1418-1423).

[0016] Debido a la escasa actividad agonista del IR3 y otros anticuerpos descritos, y su incapacidad para inhibir significativamente el crecimiento de las células tumorales tales como las células MCF-7 en las condiciones más fisiológicas de estimulación con el suero (en vez de la estimulación mediante el IGF-I o el IGF-II añadidos exógenamente a medio sin suero), existe la necesidad de anticuerpos nuevos contra el receptor del IGF-I que inhiban significativamente el crecimiento estimulado por el suero de células tumorales, pero que no muestren una actividad agonista significativa por sí mismos.

Grant E. S. et al., 1998 (The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 83(9), págs. 3252-3257), la patente internacional WO02/053596 de Pfizer, Inc., y Abgenix, Inc. y la patente internacional WO03/059951 de Pierre Fabre Medicament, describen anticuerpos que tienen afinidad por el IGF-IR.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención da a conocer los anticuerpos de la reivindicación 1 y los conjugados de la reivindicación 6.

[0017] En consecuencia, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos de esta invención se fijan específicamente al receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I e inhiben la actividad celular del receptor al antagonizar el receptor, y también están desprovistos sustancialmente de actividad agonista hacia el receptor.

[0018] Por consiguiente, en una primera realización, se da a conocer el anticuerpo EM164 murino, que se caracteriza completamente en la presente memoria con respecto a la secuencia de aminoácidos de sus regiones variables tanto de la cadena ligera como de la pesada, a la secuencia del ADN de los genes de las regiones variables de la cadena ligera y de la pesada, a la identificación de su CDR (regiones determinantes de la complementariedad), a la identificación de los aminoácidos de la superficie y a los medios para su expresión de forma recombinante.

[0019] En una segunda realización, se dan a conocer versiones del anticuerpo EM164 humanizadas o con la superficie remodelada, en las que los restos expuestos en la superficie del anticuerpo o de sus fragmentos están reemplazados tanto en la cadena ligera como en la pesada para parecerse mucho más a las superficies de anticuerpos humanos conocidos. Tales anticuerpos humanizados pueden tener más utilidad, en comparación con el EM164 murino, como agentes terapéuticos o diagnósticos. Las versiones humanizadas del anticuerpo EM164 están también caracterizadas totalmente en la presente memoria con respecto a la secuencia de aminoácidos de las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la pesada, a la secuencia del ADN de los genes de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, a la identificación de las CDR, a la identificación de los aminoácidos de superficie y a la descripción de los medios para expresarlas en forma recombinante.

[0020] En una tercera realización, se da a conocer un anticuerpo que es capaz de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa en la que la concentración del receptor del IGF-I está elevada en más del 80% en presencia de un estimulante del crecimiento, tal como, por ejemplo, suero, factor de crecimiento insulínico de tipo I y factor de crecimiento insulínico tipo II.

[0021] En una cuarta realización, se da a conocer un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se fija específicamente a un receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I que tiene una cadena pesada que incluye las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID n.º: 1-3, respectivamente.

[0022]

SYWMH	(SEQ ID n.º: 1),
EINPSNGRTNYNEKFKR	(SEQ ID n.º: 2),
GRPDYYGSSKWYFDV	(SEQ ID n.º: 3);

y que tiene una cadena ligera que comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID n.º: 4-6:

RSSQSIVHSNVNTYLE	(SEQ ID n.º: 4);
KVSNRFS	(SEQ ID n.º: 5);
FQGSHVPPT	(SEQ ID n.º: 6);

5

y en donde, dicho anticuerpo aislado o fragmento del mismo es un agonista de dicho receptor y está desprovisto de actividad agonista hacia dicho receptor.

[0023] En una quinta realización, se dan a conocer anticuerpos que tienen una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID n.º: 7.

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIG
 EINPSNGRTNYNEKFKRKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFARGR
 PDYYGSSKWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:7).

10

[0024] De igual forma, se dan a conocer anticuerpos que tienen una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID n.º: 8.

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
 KVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTK
 LEIKR (SEQ ID NO:8).

15

[0025] En una sexta realización, se dan a conocer anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera humanizada o con la superficie remodelada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una de las SEQ ID n.º: 9-12:

DVVMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPRLLIY
 KVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGT
 KLEIKR (SEQ ID NO:9);

DVLMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
 KVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGT
 KLEIKR (SEQ ID NO:10);

DVLMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPRLLIY
 KVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGT
 KLEIKR (SEQ ID NO:11); or

DVVMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY

KVSNRFGVDPDRFSGSGAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGT

KLEIKR (SEQ ID NO:12).

De igual forma, los anticuerpos que tienen una región variable de cadena pesada humanizada o con la superficie remodelada pueden tener un secuencia de aminoácidos que se corresponde a la SEQ ID n.º: 13.

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG

EINPSNGRTNYNQKFQGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFARGR

PDYYGSSKWFYFDWWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:13).

5 La presente invención además da a conocer conjugados de dichos anticuerpos, en los que un agente citotóxico está unido covalentemente, de forma directa o a través de un conector escindible o no escindible, a un anticuerpo o un fragmento de fijación a epítipo de un anticuerpo de la presente invención. En realizaciones preferentes, el agente citotóxico es un taxol, un maitansinoide, CC-1065 o análogo de CC-1065.

10 La presente invención además da a conocer anticuerpos o fragmentos de los mismos que están además marcados para su uso en investigación o en aplicaciones diagnósticas. En las realizaciones preferentes, la marcación es una radiomarcación, un fluoróforo, un cromóforo, un agente para técnicas de imagen o un ion metálico.

Un método para diagnóstico puede comprender el uso de dichos anticuerpos, o fragmentos, marcados administrados a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer, en el que se mide o monitoriza la distribución de la marcación dentro del cuerpo del sujeto.

15 En una octava realización, la invención da a conocer medicamentos y composiciones para el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer en el que está elevada la concentración del receptor del IGF-I, que comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos. El cáncer puede ser uno o más de, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer de páncreas y otro cáncer aún por determinar en el que la concentración del receptor del IGF-I esté elevada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La figura 1 muestra un análisis de clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) de la fijación específica del anticuerpo EM164 purificado a células que sobreexpresan el receptor del IGF-I Y1251F humano o el receptor humano de la insulina.

La figura 2 muestra una curva de titulación de la fijación para la fijación del anticuerpo EM164 al receptor del IGF-I humano biotinilado.

La figura 3 muestra la inhibición de la fijación del IGF-I biotinilado a las células MCF-7 de cáncer de mama humano debida al anticuerpo EM164.

30 La figura 4 muestra la inhibición de la autofosforilación, estimulada por el IGF-I, del receptor del IGF-I en las células MCF-7 debida al anticuerpo EM164.

La figura 5 muestra la inhibición de la fosforilación del IRS-1, estimulada por el IGF-I, en las células MCF-7 debida al anticuerpo EM164.

35 La figura 6 muestra la inhibición de la transducción de la señal, estimulada por el IGF-I, en las células SaOS-2 debida al anticuerpo EM164.

La figura 7 muestra el efecto del anticuerpo EM164 sobre el crecimiento y la supervivencia de las células MCF-7 en diferentes condiciones de crecimiento, tal y como se evaluó mediante ensayo MTT.

La figura 8 muestra el efecto del anticuerpo EM164 sobre el crecimiento y la supervivencia de las células MCF-7 en presencia de diferentes concentraciones de suero.

40 La figura 9 muestra la inhibición del crecimiento y la supervivencia, estimulados por el IGF-I y por el suero, de las células NCI-H838 debida al anticuerpo EM164.

La figura 10 muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo EM164, taxol o una politerapia de anticuerpo EM164 y taxol, sobre el crecimiento de un xenoinjerto de cáncer de pulmón Calu-6 en los ratones.

La figura 11 muestra la competición entre la fijación del anticuerpo EM164 humanizado (v. 1.0) y el anticuerpo EM164 murino.

5 La figura 12 muestra las secuencias del ADNc (SEQ ID n.º: 49) y de los aminoácidos (SEQ ID n.º: 50) de la región variable y del líder de la cadena ligera del anticuerpo EM164 murino contra el receptor del IGF-I. La flecha marca el comienzo del marco 1. Las 3 secuencias de las CDR según Kabat están subrayadas.

10 La figura 13 muestra las secuencias del ADNc (SEQ ID n.º: 51) y de los aminoácidos (SEQ ID n.º: 52) de la región variable y de la cadena pesada principal del anticuerpo EM164 murino contra el receptor del IGF-I. La flecha marca el comienzo del marco 1. Las 3 secuencias de las CDR según Kabat están subrayadas.

15 La figura 14 muestra las secuencias de aminoácidos de las CDR de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo EM164 que se determinaron de las definiciones de clase canónica de Chothia. También se muestran las definiciones del programa informático de modelización de AbM para las CDR de la cadena pesada. Cadena ligera: La CDR1 es la SEQ ID n.º: 4, la CDR2 es la SEQ ID n.º: 5, y la CDR3 es la SEQ ID n.º: 6. Cadena pesada: La CDR1 es la SEQ ID n.º: 1, la CDR2 es la SEQ ID n.º: 2 y la CDR3 es la SEQ ID n.º: 3. Cadena pesada de AbM: La CDR1 es la SEQ ID n.º: 53, la CDR2 es la SEQ ID n.º: 54 y la CDR3 es la SEQ ID n.º: 55.

La figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y de la cadena pesada para el anticuerpo EM164 contra el receptor del IGF-I alineadas con las secuencias de los genes Cr1 (SEQ ID n.º: 56) y J558.c (SEQ ID n.º: 57) de células reproductoras. Los guiones (-) indican identidad de secuencia.

20 La figura 16 muestra los plásmidos utilizados para construir y expresar los anticuerpos EM164 humanizados y quiméricos recombinantes. A) un plásmido para clonar una cadena ligera, B) un plásmido para clonar una cadena pesada, c) un plásmido de expresión del anticuerpo de mamífero.

25 La figura 17 muestra las 10 secuencias de aminoácidos más homólogas de las cadenas ligeras detectadas selectivamente de los 127 anticuerpos en el conjunto de archivos de estructura utilizados para predecir los restos de superficie de EM164. em164 LC (SEQ ID n.º: 58), 2jel (SEQ ID n.º: 59), 2pcp (SEQ ID n.º: 60), 1nqb (SEQ ID n.º: 61), 1kel (SEQ ID n.º: 62), 1hyx (SEQ ID n.º: 63), 1igf (SEQ ID n.º: 64), 1tet (SEQ ID n.º: 65), 1clz (SEQ ID n.º: 66), 1bln (SEQ ID n.º: 67), 1cly (SEQ ID n.º: 68), consenso (SEQ ID n.º: 69).

30 La figura 18 muestra las 10 secuencias de aminoácidos más homólogas de las cadenas pesadas detectadas selectivamente de los 127 anticuerpos en el conjunto de archivos de estructura utilizados para predecir los restos de superficie de EM164. em164 HC (SEQ ID n.º: 70), 1nqb (SEQ ID n.º: 71), 1ngp (SEQ ID n.º: 72), 1fbi (SEQ ID n.º: 73), lafv (SEQ ID n.º: 74), 1yuh (SEQ ID n.º: 75), 1plg (SEQ ID n.º: 76), 1d5b (SEQ ID n.º: 77), 1ae6 (SEQ ID n.º: 78), 1axs (SEQ ID n.º: 79), 3hfl (SEQ ID n.º: 80), consenso (SEQ ID n.º: 81).

35 La figura 19 muestra la accesibilidad media de cada resto de la región variable de la cadena ligera (A) y de la pesada (B) de las 10 estructuras más homólogas. Los números representan los números de Kabat de la posición de la secuencia del anticuerpo.

La figura 20 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera para los anticuerpos EM164 murino (muEM164) y el EM164 humanizado (huEM164). muEM164 (SEQ ID n.º: 82), huEM164 V1.0 (SEQ ID n.º: 83), huEM164 V1.1 (SEQ ID n.º: 84), huEM164 V1.2 (SEQ ID n.º: 85), huEM164 V1.3 (SEQ ID n.º: 86).

40 La figura 21 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos EM164 murino (muEM164, SEQ ID n.º: 87) y humanizado (huEM164, SEQ ID n.º: 88).

La figura 22 muestra las secuencias del ADN y de aminoácidos de la región variable de huEM164 v1.0 tanto para la cadena ligera (ADN, SEQ ID n.º: 89, aminoácidos SEQ ID n.º: 90) como para la pesada (ADN, SEQ ID n.º: 91, aminoácidos SEQ ID n.º: 92).

45 La figura 23 muestra las secuencias del ADN y de los aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de EM164 humanizado v1.1 (ADN, SEQ ID n.º: 93; aminoácidos, SEQ ID n.º: 94), v1.2 (ADN, SEQ ID n.º: 95; aminoácidos SEQ ID n.º: 96) y v1.3 (ADN, SEQ ID n.º: 97; aminoácidos SEQ ID n.º: 98).

La figura 24 muestra que el anticuerpo humanizado EM164 v1.0 y el anticuerpo murino EM164 inhiben el crecimiento y la supervivencia, estimulados por el IGF-I, de las células MCF-7.

La figura 25 muestra que el EM164 detiene el ciclo celular, estimulado por el IGF-I, de las células MCF-7.

La figura 26 muestra que el EM164 detiene el efecto antiapoptótico del IGF-I y el suero. El tratamiento con el EM164 da lugar a la muerte celular por apoptosis como se demuestra por el aumento de la concentración de la forma escindida de la proteína CK18.

5 La figura 27 muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo EM164, gemcitabina o una combinación del anticuerpo EM164 y gemcitabina, sobre el crecimiento de los xenoinjertos de cáncer de páncreas humanos BxPC-3 en los ratones inmunodeficientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Los presentes inventores han descubierto y mejorado nuevos anticuerpos que se fijan específicamente al receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I humano (IGF-IR) sobre la superficie celular. Los anticuerpos y los fragmentos tienen la capacidad única de inhibir las funciones celulares del receptor sin la capacidad para activar el receptor por sí mismos. Por consiguiente, aunque ya se conocían anteriormente anticuerpos que se fijan e inhiben específicamente al IGF-IR y que también activan el receptor incluso en ausencia de ligandos del IGF-IR, los anticuerpos o fragmentos de la presente invención antagonizan con el IGF-IR, pero están sustancialmente desprovistos de la actividad agonista. Además, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos de la presente invención inhiben el crecimiento de células tumorales humanas, tales como las células MCF-7, en más del 80% en presencia de suero, que es una inhibición mayor que la obtenida con los anticuerpos anti-IGF-IR que ya se conocían.

20 La presente invención parte de un anticuerpo murino anti-IGF-IR, en la presente memoria EM164, que está totalmente caracterizado con respecto a la secuencia de aminoácidos de tanto la cadena ligera como la pesada, a la identificación de las CDR, a la identificación de los aminoácidos de superficie y a los medios para su expresión en forma recombinante.

Las secuencias de las células reproductoras se muestran en la figura 15 alineadas con la secuencia del EM164. La comparación identifica las probables mutaciones somáticas en el EM164, que incluyen una en la CDR1 de la cadena ligera y otra en la CDR2 de la cadena pesada.

25 Las secuencias primarias de aminoácidos y del ADN de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo EM164, y de las versiones humanizadas, se describen en la presente memoria. No obstante, el alcance de la presente invención no se limita a anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. En lugar de ello, todos los anticuerpos y fragmentos que se fijan específicamente a un receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I y que antagonizan con la actividad biológica del receptor, pero que están sustancialmente desprovistos de actividad agonista, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden diferir del anticuerpo EM164, o de los derivados humanizados, en las secuencias de aminoácidos de su armazón, de las CDR, de la cadena ligera y de la cadena pesada, y seguirían estando dentro del alcance de la presente invención.

35 Las CDR del anticuerpo EM164 se identifican mediante modelización, y se han predicho sus estructuras moleculares. De nuevo, mientras que las CDR son importantes para el reconocimiento de los epítomos, no son esenciales para los anticuerpos y los fragmentos de la invención. En consecuencia, se dan a conocer anticuerpos y fragmentos que tienen mejores propiedades producidas mediante, por ejemplo, maduración de la afinidad de un anticuerpo de la presente invención.

40 Diversos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, así como imitaciones de anticuerpos, se pueden producir fácilmente mediante mutación, delección y/o inserción en la secuencia de las regiones variable y constante que flanquean un conjunto particular de CDR. Así, por ejemplo, se pueden dar diferentes clases de Ac para un conjunto determinado de CDR mediante la sustitución de diferentes cadenas pesadas, mediante lo cual se pueden producir, por ejemplo, los tipos e isotipos de anticuerpo IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD e IgE. Se pueden producir anticuerpos artificiales con el emplazamiento de un conjunto determinado de CDR en un marco totalmente sintético. La terminología «variable» se utiliza en la presente memoria para describir determinadas partes de los dominios variables cuya secuencia difiere de unos anticuerpos a otros y que utilizan para la fijación y especificidad de cada uno de los anticuerpos frente a su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no está homogéneamente distribuida por lo general por los dominios variables de los anticuerpos. Por regla general, se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en el dominio variable de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan el marco. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada comprenden cada uno cuatro regiones marco, cuya configuración predominante es de hoja β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que se conectan las estructuras de hoja β , y en algunos casos forman parte de ella. Las regiones marco mantienen CDR de cada cadena muy próximas entre sí y, junto a las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de fijación al antígeno de los anticuerpos (E. A. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, 1991, NIH). Los dominios constantes no están implicados directamente en la fijación de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran distintas funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

5 Los anticuerpos humanizados, o los anticuerpos adaptados para que no los rechacen otros animales, se pueden generar mediante varias tecnologías tales como remodelación de la superficie e injerto de CDR. En la tecnología de remodelación de la superficie, la modelización molecular, el análisis estadístico y la mutagénesis se combinan para ajustar las superficies que no intervienen en las CDR de las regiones variables para que se parezcan a las superficies de los anticuerpos conocidos del hospedador deseado. Las estrategias y los métodos para remodelar la superficie de los anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos en un huésped diferente, se describen en la patente de los EE.UU. n.º 5.639.641. En la tecnología de injerto de CDR, las CDR murinas de las cadenas ligera y pesada se injertan en una secuencia marco totalmente humana.

10 Los anticuerpos funcionalmente equivalentes incluyen, por ejemplo, anticuerpos de una sola cadena, humanizados y quiméricos, así como fragmentos de los mismos. Los métodos para producir tales equivalentes funcionales se describen en la solicitud PCT de patente internacional 93/21319, la solicitud de patente europea n.º: 239.400; la solicitud PCT de patente internacional WO 89/09622; la solicitud de patente europea 338.745; y la solicitud de patente europea EP 332.424.

15 Los equivalentes funcionales incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos de las regiones variable o hipervariable de los anticuerpos de la invención. «Sustancialmente iguales», tal y como se aplica a una secuencia de aminoácidos, se define en la presente memoria como una secuencia con al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 90%, y más preferentemente de al menos aproximadamente el 95%, con otra secuencia de aminoácidos, según se determina por el método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988).

20 Los anticuerpos quiméricos tienen preferentemente regiones constantes que se obtienen sustancial o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables que se obtienen sustancial o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero diferente a un humano. Las formas humanizadas de los anticuerpos se construyen sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en un dominio marco humano, por ejemplo véase la publicación de patente internacional PCT. n.º WO92/22653. Los anticuerpos humanizados preferentemente tienen regiones constantes y regiones variables además de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que se obtienen sustancial o exclusivamente de las correspondientes regiones a partir de anticuerpo humanos correspondientes y las CDR que se obtienen sustancial o exclusivamente de un mamífero diferente a un humano.

30 Los equivalentes funcionales también incluyen fragmentos de anticuerpos de una sola cadena, también conocidos como anticuerpos monocatenarios (scFvs). Estos fragmentos contienen al menos un fragmento de una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la parte variable de anticuerpo (VH) ligada a al menos un fragmento de una secuencia de la cadena ligera de la región variable de anticuerpo (VL) con o sin uno o más conectores que las unan. Tal conector puede ser un péptido flexible y corto seleccionado para garantizar que se produzca el plegamiento tridimensional correcto de los dominios (VL) y (VH) una vez que se unen, para así mantener la especificidad de fijación por la molécula diana de todo el anticuerpo del cual procede el fragmento de anticuerpo monocatenario. Generalmente, el extremo carboxilo de la secuencia (VL) o (VH) se puede unir covalentemente por tal péptido conector al aminoácido en el extremo de una secuencia (VL) y (VH) complementaria. Se pueden generar fragmentos de anticuerpos monocatenarios mediante clonación molecular, genoteca de exposición de anticuerpos en fagos o técnicas similares. Se pueden producir estas proteínas en las células eucariotas o procariotas, incluidas las bacterias.

40 Los fragmentos de anticuerpo monocatenario contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables o determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos completos descritos en esta especificación, pero carecen de algunos o todos los dominios constantes de estos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la fijación a los antígenos, pero constituyen una porción importante de la estructura del anticuerpo entero. Por lo tanto, los fragmentos de anticuerpo monocatenario pueden solventar algunos de los problemas asociados a la utilización de los anticuerpos que contienen parte de un dominio constante o todo él. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios tienden a estar libres de interacciones indeseables entre las moléculas biológicas y la región constante de la cadena pesada y otra actividad biológica indeseable. Aún más, los fragmentos de anticuerpo monocatenario son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden, por consiguiente, tener una mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, lo que permite que los fragmentos de anticuerpo monocatenario se localicen y se fijen a los sitios de fijación de los antígenos diana con más eficacia. Igualmente, se pueden producir fragmentos de anticuerpo a una escala relativamente grande en las células procariotas, lo que facilita su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpos monocatenarios hace que la probabilidad de provocar una respuesta inmunitaria en un destinatario sea menor que la de los anticuerpos completos.

55 Los equivalentes funcionales incluyen además fragmentos de anticuerpos que tienen las mismas características de fijación, o unas comparables, a las del anticuerpo completo. Tales fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo completo, aunque los fragmentos que carecen de alguna de

tales regiones, tal como los que tienen tres, cuatro o cinco CDR, también son funcionales. Además, los equivalentes funcionales pueden ser o pueden combinar miembros de cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de las mismas.

5 El conocimiento de las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico para el anticuerpo EM164 contra el receptor del IGF-I y sus variantes humanizadas, que se describen en la presente memoria, se pueden utilizar para desarrollar otros anticuerpos que también se fijan al receptor del IGF-I humano e inhiben las funciones celulares del receptor del IGF-I. Varios estudios han supervisado los efectos de la introducción de uno o más cambios de aminoácido en distintas posiciones en la secuencia de un anticuerpo, basándose en el conocimiento de la secuencia del anticuerpo primario, en sus propiedades tales como la fijación, y en el nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539).

15 En estos estudios se han generado variantes del anticuerpo primario cambiando la secuencia de los genes de las cadenas ligera y pesada en las CDR1, CDR2, CDR3 o las regiones marco, mediante métodos tales como la mutagénesis específica de sitio mediada por oligonucleótidos, la mutagénesis de casete, la PCR propensa a errores, el barajado de ADN o cepas mutadoras de *E. coli* (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, capítulo 16, págs. 277-291, en «Phage Display of Peptides and Proteins», Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos con los que se cambia la secuencia del anticuerpo primario han dado lugar a una mejora de la afinidad de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628).

Mediante una estrategia dirigida similar de cambiar uno o más restos aminoacídicos del anticuerpo, las secuencias de anticuerpo descritas en esta invención se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos contra el receptor del IGF-I con una funcionalidad mejorada.

25 Los conjugados de la presente invención comprenden el anticuerpo, sus fragmentos y sus análogos tal y como está descrito en la presente memoria, unidos a un agente citotóxico. Agentes citotóxicos preferentes son maitansinoides, taxanos y análogos de CC-1065. Los conjugados se pueden preparar mediante métodos in vitro. Para unir el agente citotóxico al anticuerpo, se utiliza un grupo conector. Se conocen bien en la técnica grupos conectores adecuados e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables en ácido, grupos fotoinestables, grupos inestables a las peptidasas y grupos inestables a las esterases. Los grupos conectores preferentes son grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, se pueden construir conjugados mediante una reacción de intercambio de disulfuros o mediante la formación de un enlace tioéter entre el anticuerpo y el agente citotóxico.

35 Los maitansinoides y los análogos de maitansinoides se encuentran entre los agentes citotóxicos preferentes. Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen el maitansinol y análogos del maitansinol. Los maitansinoides adecuados se describen en las patentes de los EE.UU. con los números 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Los taxanos son también agentes citotóxicos preferentes. Los taxanos adecuados para uso en la presente invención se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 6.372.738 y 6.340.701.

40 El CC-1065 y sus análogos son también fármacos citotóxicos preferentes para uso en la presente invención. El CC-1065 y sus análogos se describen en las patentes de los EE.UU. con los números 6.372.738; 6.340.701; 5.846.545 y 5.585.499.

45 Un candidato atractivo para preparar tales conjugados citotóxicos es el CC-1065, que es un potente antibiótico antitumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. El CC-1065 es unas 1000 veces más potente in vitro que los fármacos antineoplásicos utilizados con más frecuencia, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B. K. Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)).

50 Los fármacos citotóxicos tales como el metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo y caliqueamicina también son adecuados para preparar conjugados de la presente invención, y las moléculas de los fármacos también se pueden unir a las moléculas de los anticuerpos a través de una molécula portadora intermediaria, tal como seroalbúmina.

55 Para aplicaciones diagnósticas, los anticuerpos de la presente invención típicamente se marcarán con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹³¹I; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como un isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al resto detectable, incluidos los métodos descritos por Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982).

5 Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de fijación competitivos, ensayos de sándwich indirectos y directos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

10 Los anticuerpos de la invención también son útiles para obtener imágenes in vivo, en donde un anticuerpo marcado con un resto detectable, tal como un agente radiopaco o un radioisótopo, se administra a un sujeto, preferentemente en el torrente circulatorio, y se analiza la presencia y localización del anticuerpo marcado en el hospedador. Esta técnica de imagen es útil en la determinación de estadio y el tratamiento de las neoplasias malignas. El anticuerpo puede estar marcado con cualquier resto que sea detectable en un huésped, mediante resonancia magnética nuclear, radiología u otros medios de detección conocidos en la técnica.

15 Los anticuerpos de la invención también son útiles como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, se inmovilizan los anticuerpos en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o un papel de filtro, mediante los métodos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de la invención también son útiles como reactivos para investigación biológica, basándose en su inhibición de la función del receptor del IGF-I en las células.

20 Para las aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o los conjugados de la invención se pueden administrar a un sujeto, en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un cierto tiempo, por las vías intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral y tópica o por inhalación. El anticuerpo también se puede administrar por las vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos. Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y los expertos en la técnica los pueden determinar según lo exija la situación clínica. Ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente de 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) solución salina al 0,9% [NaCl al 0,9% (p/v)], y (3) dextrosa al 5% (p/v). El método de la presente invención se puede poner en práctica in vitro, in vivo o ex vivo.

30 En otros tratamientos terapéuticos, los medicamentos y/o composiciones que comprenden los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados de la invención se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, agentes citotóxicos o citostáticos. El taxol es un agente terapéutico preferente que es también un agente citotóxico.

35 Los agentes terapéuticos del cáncer son aquellos agentes que buscan destruir o limitar el crecimiento de las células cancerosas al mismo tiempo que hacen el mínimo daño al huésped. Por lo tanto, tales agentes pueden explotar cualquier diferencia en las propiedades de las células cancerosas (p. ej., metabolismo, vascularización o presentación de antígenos en la superficie celular) de las células huésped sanas. Las diferencias en la morfología tumoral son los sitios posibles para la intervención: por ejemplo, el segundo medicamento puede ser un anticuerpo tal como un anticuerpo anti-VEGF que es útil para retrasar la vascularización del interior de un tumor sólido, lo que enlentece su tasa de crecimiento. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a ellos, complementos tales como el hidrocloreto de granisetron, inhibidores de andrógenos tales como leuprorelina, antibióticos tales como doxorubicina, antiestrógenos tales como tamoxifeno, antimetabolitos tales como interferón α -2a, agentes citotóxicos tales como taxol, inhibidores enzimáticos tales como inhibidor de la ras farnesil-transferasa, inmunomoduladores tales como aldesleucina y derivados de la clormetina tales como melfalán HCl, y similares.

45 Cuando se presenta en una forma farmacéutica acuosa, en vez de estar liofilizado, el anticuerpo típicamente se formulará a una concentración de unos 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una variación amplia fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo o conjugado dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si los anticuerpos se administran con propósitos preventivos o terapéuticos, la evolución del tratamiento anterior, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico de cabecera. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

55 Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 0,015 mg a 15 mg de anticuerpo/kg de masa del paciente es una dosis inicial candidata para la administración al paciente, tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones independientes, como mediante infusión continua. Para la administración repetida durante varios días o más, según la enfermedad, se repite el tratamiento hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, pueden ser útiles otras posologías y por ello no se descartan.

Ejemplos

A continuación se describe la invención por referencia a los ejemplos que siguen, que son sólo ilustrativos, y que no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Anticuerpo EM164 murino

5 En este primer ejemplo se describe la estructura de aminoácidos primaria completa y la secuencia del ADNc de un anticuerpo murino de la presente invención, junto con sus propiedades de fijación y los medios para su expresión en la forma recombinante. Por consiguiente, se da a conocer una descripción total y completa de un anticuerpo de la invención y su preparación, de tal forma que cualquier experto en las técnicas inmunológicas será capaz de preparar dicho anticuerpo sin una excesiva experimentación.

A. Generación del hibridoma del anticuerpo monoclonal contra el receptor del IGF-I

10 Se utilizó una estirpe celular que expresa el receptor del IGF-I humano con una mutación Y1251F para la inmunización, ya que expresaba un número elevado de receptores del IGF-I (~107 por célula). La mutación Y1251F en el dominio citoplasmático del receptor del IGF-I daba lugar a la pérdida de la señalización de transformación y la antiapoptótica, pero no afectaba a la fijación del IGF-I ni a la señalización mitógena estimulada por el IGF-I (O'Connor, R. et al., 1997, Mol. Cell. Biol., 17, 427-435; Miura, M. et al., 1995, J. Biol. Chem., 270, 22639-22644). Por lo demás, la mutación no afectaba a la generación de anticuerpos porque el anticuerpo de este ejemplo se fijaba al dominio extracelular del receptor del IGF-I, que era idéntico para el mutante Y1251F y para el receptor de natural.

15 Se generó una estirpe celular que expresaba el receptor del IGF-I humano con una mutación Y1251F a partir de células similares a las 3T3 de un ratón deficiente en el receptor del IGF mediante la transfección con el gen del receptor del IGF-I humano mutante Y1251F junto con un gen de resistencia a la puromicina, y se seleccionó con puromicina (2,5 µg/ml) y mediante clasificación FACS para la expresión elevada del receptor del IGF-I (Miura, M. et al., 1995, J. Biol. Chem., 270, 22639-22644). Se seleccionó posteriormente una estirpe celular que tenía un nivel elevado de expresión del receptor del IGF-I utilizando una alta concentración de puromicina, tal como 25 µg/ml, que era tóxica para la mayoría de las células. Se recogieron las colonias supervivientes y las que mostraban un nivel elevado de expresión del receptor del IGF-I.

20 Se inmunizaron ratones hembra CAF1/J de 6 meses de edad por vía intraperitoneal el día 0 con células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I humano mutante Y1251F (5 x 10⁵ células, suspendidas en 0,2 ml de PBS). Los animales se estimularon con una suspensión celular de 0,2 ml como sigue: día 2, 1 x 10⁶ células; día 5, 2 x 10⁶ células; días 7, 9, 12 y 23, 1 x 10⁷ células. El día 26 se sacrificó un ratón y se le extirpó el bazo.

30 El bazo se aplastó entre dos portaobjetos de cristal esmerilado para obtener una suspensión de células aisladas, que se lavó con medio RPMI sin suero (SFM) que contenía penicilina y estreptomycin. Se resuspendió el sedimento celular del bazo en 10 ml de una solución de cloruro de amonio al 0,83% (p/v) en agua durante 10 min en hielo para lisar los glóbulos rojos y a continuación se lavó con el medio sin suero (SFM). Las células esplénicas (1,2 x 10⁸) se juntaron con células de mieloma (4 x 10⁷) de la estirpe celular de mieloma de ratón no secretante P3X63Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD; n.º de cat. CRL1580) en un tubo, y se lavó con el medio RPMI-1640 sin suero (SFM). Se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en el medio residual. Se colocó el tubo en un vaso de precipitados con agua a 37°C y se añadieron lentamente 1,5 ml de la solución de polietilenglicol (PEG al 50% (p/v), masa molecular media de 1500 en HEPES a 75 mM, pH 8) con un goteo de 0,5 ml/min mientras se agitaba suavemente el tubo. Después de esperar un minuto, se añadieron 10 ml de SFM como sigue: 1 ml durante el primer minuto, 2 ml durante el segundo minuto y 7 ml durante el tercer minuto. Después se añadieron lentamente otros 10 ml lentamente durante 1 minuto. Se sedimentaron las células mediante centrifugación, se lavaron en un SFM y se resuspendieron en medio de crecimiento RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal (SBF) al 5%, hipoxantina/aminopterin/timidina (HAT), penicilina, estreptomycin y complemento de clonación en hibridomas al 10% (HCS). En las placas de 96 pocillos con el fondo plano para cultivo de tejidos se sembraron 2 x 10⁵ células esplénicas en 200 µl por pocillo. Después de 5 a 7 días, se retiraron 100 µl y se reemplazaron por medio de crecimiento complementado con hipoxantina/timidina (HT) y SBF al 5%. Las condiciones generales utilizadas para la inmunización y la producción de hibridomas fueron las que se describen en J. Langone y H. Vunakis (Eds., Methods in Enzymology, Vol. 121, «Immunochemical Techniques, Part I»; 1986; Academic Press, Florida) y E. Harlow y D. Lane («Antibodies: A Laboratory Manual»; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Se pueden utilizar otras técnicas de inmunización y producción de hibridoma, que conocen bien los expertos en la técnica.

50 Los sobrenadantes del cultivo de clones de hibridoma se seleccionaron por la fijación al receptor del IGF-I humano purificado mediante ELISA, la fijación específica a células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I humano, y la ausencia de fijación a células que sobreexpresan el receptor de la insulina humano mediante la detección selectiva con ELISA y FACS que se describe más adelante. Se expandieron y subclonaron los clones que mostraban una mayor afinidad de fijación a las células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I humano que a las células que sobreexpresaban el receptor de la insulina humano. Los sobrenadantes del cultivo de los subclones se cribaron adicionalmente mediante los ensayos de fijación anteriores. Con este procedimiento, se seleccionó el subclón 3F1-

C8-D7 (EM164) y se clonaron y secuenciaron los genes de la cadena ligera y la pesada tal y como se describe más adelante.

Se aisló el receptor del IGF-I humano para utilizarlo en la detección selectiva de sobrenadantes de clones de hibridoma que se fijaban al receptor del IGF-I mediante el método de más adelante. Se preparó el IGF-I biotinilado por modificación del IGF-I recombinante mediante reactivos de biotinilación tales como sulfo-NHS-LC-biotina, sulfo-NHS-SS-biotina o NHS-PEO4-biotina. El IGF-I biotinilado se adsorbió en perlas de estreptavidina-agarosa y se incubó con lisado de células que sobreexpresaban el receptor del IGF mutante Y1251F o el receptor natural humano. Se lavaron las perlas y se eluyeron con un tampón que contenía urea de 2 a 4 M y detergente tal como Triton X-100 u octil- β -glucósido. El receptor del IGF-I eluido se dializó contra PBS y se analizó la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras, que mostró las bandas de las cadenas α y β del receptor del IGF-I de masas moleculares de unos 135 kDa y 95 kDa, respectivamente.

Para comprobar la fijación de los sobrenadantes de hibridomas al receptor del IGF-I purificado, se revistió una placa de ELISA Immulon-4HB (Dynatech) con una muestra del receptor del IGF-I humano purificado (preparada mediante diálisis a partir de la elución en urea/octil- β -glucósido de la muestra purificada por afinidad) diluido en tampón CHES a 50 mM a pH 9,5 (100 μ l; 4°C, durante una noche). Se bloquearon los pocillos con 200 μ l de tampón de bloqueo (SAB a 10 mg/ml en tampón TBS-T que contiene Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,5 y Tween-20 al 0,1%) y se incubó con sobrenadantes de clones de hibridomas (100 μ l; diluidos en tampón de bloqueo) durante aproximadamente 1 hora a 12 horas, se lavó con tampón TBS-T y se incubó con un anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRP) (100 μ l; 0,8 μ g/ml en tampón de bloqueo; Jackson ImmunoResearch Laboratories), seguido de lavados y la detección utilizando el sustrato ABTS/H₂O₂ a 405 nm (ABTS a 0,5 mg/ml, H₂O₂ al 0,03% en tampón de citrato a 0,1 M, pH 4,2). Típicamente, un sobrenadante de un subclón de hibridoma 3F1 producía una señal de unas 1,2 unidades de absorbancia en 3 min de revelado, a diferencia de los valores de 0,0 obtenidos de los sobrenadantes de algunos otros clones de hibridomas. Las condiciones generales de este ELISA fueron parecidas a las condiciones de ELISA estándares para la fijación al anticuerpo y la detección que se han descrito en E. Harlow y D. Lane («Using Antibodies: A Laboratory Manual»; 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York), cuyas condiciones también se pueden utilizar.

La detección selectiva de la fijación específica al receptor del IGF-I humano y no al receptor de la insulina humano en los sobrenadantes de los hibridomas se realizó por ELISA en las estirpes celulares que sobreexpresaban el receptor Y1251F-IGF-I humano y en las estirpes celulares que sobreexpresaban el receptor de insulina humano. Ambas estirpes celulares se generaron a partir de células de tipo 3T3 de ratones deficientes en el receptor del IGF-I. Las células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I y las células que sobreexpresaban el receptor de la insulina se recogieron por separado de frascos de cultivo de tejidos mediante un tratamiento rápido con tripsina/EDTA, se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía SBF al 10%, se sedimentaron por centrifugación y se lavaron con PBS. Las células lavadas (100 μ l de aproximadamente 1-3 x 10⁶ células/ml) se añadieron en los pocillos de una placa Immulon-2HB recubierta con fitohemaglutinina (100 μ l de PHA a 20 μ g/ml), se centrifugaron y se dejó que se adhirieran a pocillos recubiertos de PHA durante 10 min. Se dio un golpecito a la placa con las células para retirar el PBS y entonces se secaron durante una noche a 37°C. Se bloquearon los pocillos con una solución de SAB a 5 mg/ml durante 1 hora a 37°C y después se lavaron suavemente con PBS. Las alícuotas de los sobrenadantes de los clones de hibridomas (100 μ l; diluidos en tampón de bloqueo) se añadieron luego a los pocillos que contenían células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I y a los pocillos que contenían células que sobreexpresaban el receptor de la insulina y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron los pocillos con PBS, se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado a la peroxidasa de rábano picante (100 μ l; 0,8 μ g/ml en tampón de bloqueo) durante 1 hora, seguido de lavados, y a continuación se detectó la fijación mediante un sustrato ABTS/H₂O₂. Un sobrenadante típico de un subclón de hibridoma 3F1 tras la incubación con células que sobreexpresan el receptor del IGF-I produjo una señal de 0,88 unidades de absorbancia a los 12 minutos de revelado, a diferencia del valor de 0,22 unidades de absorbancia que se obtenía durante la incubación con células que sobreexpresan el receptor de la insulina humano.

Se dejó crecer el hibridoma en frascos CL 350 de Integra (Integra Biosciences, Maryland), según las especificaciones del fabricante, para proporcionar el anticuerpo EM164 purificado. Se obtuvo un rendimiento del anticuerpo de unos 0,5-1 mg/ml en los sobrenadantes recogidos de los frascos de Integra, según la cuantificación por ELISA y la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS teñido con azul de Coomassie utilizando estándares para anticuerpos. Se purificó el anticuerpo por cromatografía de afinidad en una columna de perlas de proteína Agarosa en condiciones de purificación estándares de carga y lavado en tampón Tris a 100 mM, pH 8,9, que contenía NaCl a 3 M, seguido de la elución en una solución de ácido acético a 100 mM que contenía NaCl a 150 mM. Las fracciones eluidas que contenían el anticuerpo se neutralizaron con una solución de K₂HPO₄ a 2 M y se dializaron en PBS a 4°C. Se determinó la concentración del anticuerpo midiendo la absorbancia a 280 nm (coeficiente de extinción = 1,4 mg⁻¹ ml cm⁻¹). Se analizó la muestra de anticuerpo purificado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras y tinción con azul de Coomassie, lo que indicó sólo bandas de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo de unos 55 kDa y 25 kDa, respectivamente. El isotipo del anticuerpo purificado era IgG1 con cadena ligera κ .

B. Caracterización de la fijación del anticuerpo EM164

La fijación específica del anticuerpo EM164 purificado se demostró mediante la clasificación de las células activadas fluorescentes (FACS) utilizando células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I humano y utilizando células que sobreexpresaban el receptor de la insulina humano (figura 1). La incubación del anticuerpo EM164 (50 a 100 nM) en 100 μ l de tampón FACS frío (SAB a 1 mg/ml en medio MEM de Dulbecco) se realizó utilizando células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I y utilizando células que sobreexpresaban el receptor de la insulina (2 x 10⁵ células/ml) en una placa de 96 pocillos de fondo curvo durante 1 hora. Se sedimentaron las células por centrifugación y se lavaron con tampón FACS frío dándole golpecitos suavemente, seguido de la incubación con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a FITC (100 μ l; 10 μ g/ml en tampón FACS) en hielo durante 1 hora. Las células se sedimentaron, se lavaron y se resuspendieron en 120 μ l de la solución de formaldehído al 1% en PBS. Se analizó la placa mediante un lector FACSCalibur (BD Biosciences).

Se obtuvo un intenso cambio de fluorescencia tras la incubación de las células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I con anticuerpo EM164, a diferencia de un cambio insignificante tras la incubación de las células que sobreexpresaban el receptor de la insulina con el anticuerpo EM164 (figura 1), lo que demostraba que el anticuerpo EM164 se fijaba selectivamente al receptor del IGF-I y que no se unía al receptor de la insulina. Los anticuerpos de control, el anticuerpo 1H7 contra el receptor del IGF-I (Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo contra el receptor α de la insulina (BD Pharmingen Laboratories), produjeron unos cambios de fluorescencia tras las incubaciones que sobreexpresaban el receptor del IGF-I y el receptor de la insulina, respectivamente (figura 1). También se observó un intenso cambio de fluorescencia mediante el análisis por FACS utilizando el anticuerpo EM164 y las células MCF-7 de cáncer de mama humano, que expresaban el receptor del IGF-I (Dufourny, B. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171), lo que demostró que el anticuerpo EM164 se unía al receptor del IGF-I humano en la superficie de las células tumorales humanas.

La constante de disociación (Kd) para la fijación del anticuerpo EM164 al receptor del IGF-I humano se determinó mediante titulación por ELISA de la fijación del anticuerpo, a varias concentraciones, tanto al receptor del IGF-I (purificado por afinidad con el IGF-I biotinilado, como más arriba) que formó directamente el revestimiento, como al receptor del IGF-I biotinilado capturado indirectamente. Se preparó el receptor del IGF-I biotinilado mediante biotinilación del lisado solubilizado con detergente a partir de las células que sobreexpresaban el receptor del IGF-I utilizando el reactivo PEO-maleimida-biotina (Pierce, Molecular Biosciences), que se purificó por afinidad con un anticuerpo contra la cadena β del receptor del IGF-I inmovilizado en perlas de agarosa-NHS, que se eluyó con urea de 2 a 4 M en tampón que contenía detergente NP-40, y que se dializó en PBS.

La determinación de la Kd para la fijación del anticuerpo EM164 al receptor del IGF-I biotinilado se realizó mediante el revestimiento de las placas Immulon-2HB con 100 μ l de estreptavidina a 1 μ g/ml en tampón de carbonato (carbonato de sodio a 150 mM, bicarbonato de sodio a 350 mM) a 4°C durante una noche. Los pocillos recubiertos con estreptavidina se bloquearon con 200 μ l de tampón de bloqueo (SAB a 10 mg/ml en tampón TBS-T), se lavaron con tampón TBS-T y se incubaron con el receptor del IGF-I biotinilado (de 10 a 100 ng) durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos que contenían el receptor del IGF-I biotinilado capturado indirectamente se lavaron y se incubaron con el anticuerpo EM164 en tampón de bloqueo a varias concentraciones (5,1 x 10⁻¹³ M a 200 nM) durante 2 h a temperatura ambiente y entonces se incubaron durante una noche a 4°C. Después se lavaron los pocillos con tampón TBS-T y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgGH+L de ratón conjugado a la peroxidasa de rábano picante (100 μ l; 0,5 μ g/ml en tampón de bloqueo) seguido de lavados y la detección con el sustrato ABTS/H₂O₂ a 405 nm. Se estimó el valor de Kd mediante regresión no lineal para una fijación a un sitio.

Se llevó a cabo una titulación parecida de la fijación con el fragmento Fab del anticuerpo EM164, preparado mediante digestión con papaína del anticuerpo, tal y como está descrito en E. Harlow y D. Lane («Using Antibodies: A Laboratory Manual»; 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

La curva de titulación de la fijación para la fijación del anticuerpo EM164 al receptor del IGF-I humano biotinilado produjo un valor de Kd de 0,1 nM (figura 2). El fragmento Fab del anticuerpo EM164 también se fijaba muy fuertemente al receptor del IGF-I humano, con un valor de Kd de 0,3 nM, lo que indicó que la fijación monomérica del anticuerpo EM164 al receptor del IGF-I también era muy fuerte.

Este valor extremadamente bajo de la constante de disociación para la fijación del receptor del IGF-I al anticuerpo EM164 se debía en parte a una tasa k_{off} muy lenta según se verificaba por la fuerte señal de fijación observada después de seguir lavando durante 1 a 2 días el anticuerpo fijado al receptor del IGF-I inmovilizado.

El anticuerpo EM164 se puede utilizar para la inmunoprecipitación del receptor del IGF-I, como se demostró mediante la incubación del lisado solubilizado con detergente de las células MCF-7 de cáncer de mama humano con el anticuerpo EM164 inmovilizado en perlas de agarosa-proteína G (Pierce Chemical Company). Se reveló un análisis de inmunotransferencia del inmunoprecipitado del anticuerpo EM164 mediante un anticuerpo policlonal de conejo contra la cadena β (extremo carboxilo) del receptor del IGF-I (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a la peroxidasa de rábano picante, seguido de lavados y una detección reforzada

de la quimioluminiscencia (ECL). El análisis de inmunotransferencia del inmunoprecipitado del EM164 con las células MCF-7 mostró bandas que correspondían a la cadena β del receptor del IGF-I de unos 95 kDa y el pro-receptor del IGF-I de unos 220 kDa. Se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones similares con otros tipos de células para comprobar la especificidad de especie de la fijación del anticuerpo EM164, que también se fija al receptor del IGF-I de las células cos-7 (mono verde de África), pero no se fijaron al receptor del IGF-I de las células 3T3 (ratón), ni a las células CHO (hámster chino) ni a las células de fibroblastos de cabra (cabra). El anticuerpo EM164 no detectó el receptor del IGF-I humano desnaturalizado con SDS en los análisis de inmunotransferencia de lisados de células MCF-7, lo que indicó que se fijaba a un epítipo conformacional del receptor del IGF-I humano no desnaturalizado nativo.

El dominio de fijación del anticuerpo EM164 se caracterizó adicionalmente con una construcción de la cadena α truncada que comprendía el dominio rico en cisteínas flanqueado por los dominios L1 y L2 (restos 1-468) fusionados con la pieza decahexamérica del extremo carboxilo (restos 704-719) y que se terminaba en una etiqueta del epítipo en el extremo carboxilo. Este receptor del IGF-I más pequeño, que carecía de los restos 469-703, se ha descrito que se fijaba al IGF-I, aunque con menos fuerza en comparación con el receptor del IGF-I completo nativo (Molina, L. et al., 2000, FEBS Letters, 467, 226-230; Kristensen, C. et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 37251-37356). Por consiguiente, se preparó una construcción de cadena α truncada del receptor del IGF-I que comprende los restos 1-468 fusionados con la pieza del extremo carboxilo que son los restos 704-719 y flanqueada por una etiqueta del epítipo myc en el extremo carboxilo. Se construyó una estirpe celular estable que expresaba esta construcción, y que también expresaba la construcción transitoriamente en las células 293T de riñón embrionario humano. Se observó una fuerte fijación del anticuerpo EM164 a esta construcción de la cadena α truncada del receptor del IGF-I. De los dos anticuerpos analizados, IR3 (Calbiochem) también se fijó a esta cadena α truncada, pero el anticuerpo 1H7 (Santa Cruz Biotechnology) no se fijó, lo que indicó que el epítipo del anticuerpo EM164 era claramente diferente del que reconocía el anticuerpo 1H7.

C. Inhibición de la fijación del IGF-I a las células MCF-7 mediante el anticuerpo EM164

La fijación del IGF-I a las células MCF-7 de cáncer de mama humano resultó inhibida por el anticuerpo EM164 (figura 3). Se incubaron células MCF-7 con o sin anticuerpo EM164 a 5 μ g/ml en medio sin suero durante 2 h, seguido de la incubación con IGF-I biotinilado a 50 ng/ml durante 20 minutos a 37°C. Después se lavaron las células dos veces con medio sin suero para retirar el IGF-I biotinilado sin fijar y luego se lisaron en HEPES a 50 mM, pH 7,4, que contenía NP-40 al 1% e inhibidores de proteasas. Se revistió una placa de ELISA Immulon-2HB con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena β del receptor del IGF-I y se utilizó para capturar el receptor del IGF-I y fijar el IGF-I biotinilado del lisado. La fijación del anticuerpo recubierto al dominio del extremo carboxilo citoplasmático de la cadena β del receptor del IGF-I no interfirió con la fijación del IGF-I biotinilado al dominio extracelular del receptor del IGF-I. Se lavaron los pocillos, se incubaron con un conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, se lavaron de nuevo y entonces se detectaron con el sustrato ABTS/H₂O₂. La inhibición de la fijación del IGF-I a las células MCF-7 mediada por el anticuerpo EM164 a 5 μ g/ml fue esencialmente cuantitativa y fue casi equivalente a la del ruido de fondo del ELISA obtenido con un control que carecía de IGF-I biotinilado.

Además del ensayo descrito más arriba para la inhibición de la fijación del IGF-I a las células MCF-7 mediada por el anticuerpo EM164, el siguiente ensayo demostró que el anticuerpo EM164 era muy eficaz a la hora de desplazar de las células MCF-7 el IGF-I fijado, como se deseaba en condiciones fisiológicas para que un anticuerpo antagonista contra el receptor del IGF-I desplazase al ligando fisiológico endógeno fijado (tal como el IGF-I o el IGF-II). En este ensayo de desplazamiento del IGF-I, las células MCF-7 cultivadas en una placa de 12 pocillos se privaron de suero y luego se incubaron con IGF-I biotinilado (20-50 ng/ml) en medio sin suero a 37°C (o a 4°C) durante 1 a 2 horas. A continuación, las células con el IGF-I biotinilado fijado se trataron con el anticuerpo EM164 o un anticuerpo de control (10-100 μ g/ml) a 37°C (o a 4°C) durante 30 min a 4 h. Luego se lavaron las células con PBS y se lisaron en tampón de lisis a 4°C que contenía NP-40 al 1%. Se llevó a cabo el ELISA como se describió más arriba para capturar el receptor del IGF-I del lisado y a continuación detectar el IGF-I biotinilado fijado al receptor utilizando el conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Este ELISA demostró que el anticuerpo EM164 era capaz de desplazar casi completamente (90% en 30 min y ~100% en 4 h) de las células a 37°C el IGF-I biotinilado prefijado, y casi el 50% en 2 horas a 4°C. En otro experimento, se incubaron células de cáncer de pulmón NCI-H833 con biotina-IGF-I, y luego se lavaron y se incubaron con el anticuerpo EM164 a 4°C durante 2 horas, lo que dio lugar a una disminución del 80% en el IGF-I biotinilado fijado. Por lo tanto, el anticuerpo EM164 era muy eficaz a la hora de desplazar de las células del cáncer el IGF-I prefijado, lo que sería importante desde el punto de vista terapéutico para el antagonismo del receptor del IGF-I mediante el desplazamiento del ligando fisiológico endógeno fijado.

La incubación de las células MCF-7 con el anticuerpo EM164 a 4°C durante 2 horas (o a 37°C durante 30 min) no dio lugar a una disminución significativa del receptor del IGF-I basándose en el análisis de inmunotransferencia con el anticuerpo contra cadena β del receptor del IGF-I (Santa Cruz Biotechnology; sc-713), aunque una incubación más larga con el anticuerpo EM164 a 37°C durante 2 horas dio lugar a una disminución del 25% del receptor del IGF-I. Por consiguiente, la inhibición de la fijación del IGF-I y el desplazamiento del IGF-I fijado conseguidos mediante el anticuerpo EM164 a 4°C y 37°C en estos experimentos a corto plazo no se pueden explicar por la disminución del receptor debido a la fijación del anticuerpo EM164. El mecanismo para la potente inhibición de la

fijación del IGF-I al receptor del IGF-I, y para el desplazamiento del IGF-I prefijado, probablemente se deba a una competición por la fijación, bien porque comparten el sitio de fijación, o bien a través de una oclusión estérica o por efectos alostéricos.

D. Inhibición de la señalización celular mediada por el receptor del IGF-I mediante el anticuerpo EM164

5 El tratamiento de las células de cáncer de mama MCF-7 y las células de osteosarcoma SaOS-2 con el anticuerpo EM164 inhibió casi por completo la señalización intracelular del receptor del IGF-I, como se muestra por la inhibición de la autofosforilación del receptor del IGF-I y por la inhibición de la fosforilación de sus efectores vía abajo, tales como el sustrato-1 del receptor de la insulina (IRS-1), Akt y Erk1/2 (figuras 4-6).

10 En la figura 4, se hicieron crecer células MCF-7 en una placa de 12 pocillos en medio regular durante 3 días y luego se trataron con el anticuerpo EM164 a 20 µg/ml (o anticuerpo de control anti-B4) en medio sin suero durante 3 días, seguido de la estimulación con IGF-I a 50 ng/ml durante 20 min a 37°C. A continuación se lisaron las células en tampón de lisis enfriado en hielo que contiene inhibidores de proteasas y de fosfatasa (tampón HEPES a 50 mM, pH 7,4, NP-40 al 1%, ortovanadato de sodio a 1 mM, fluoruro de sodio a 100 mM, pirofosfato de sodio a 10 mM, EDTA a 2,5 mM, leupeptina a 10 µM, pepstatina a 5 µM, PMSF a 1 mM, benzamidina a 5 mM y aprotinina a 5 µg/ml). Se revistió previamente una placa de ELISA con el anticuerpo monoclonal TC123 contra el extremo carboxilo de la cadena β del receptor del IGF-I y se incubó con las muestras de los lisados durante 5 h a temperatura ambiente para capturar el receptor del IGF-I. Después, los pocillos que contenían el receptor del IGF-I capturado se lavaron y se incubaron con el anticuerpo biotinilado anti-fosfotirosina (PY20; 0,25 µg/ml; BD Transduction Laboratories) durante 30 minutos, seguido de lavados y de incubación con el conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (0,8 µg/ml) durante 30 minutos. Se lavaron los pocillos y se detectaron con el sustrato ABTS/H₂O₂. El uso de un anticuerpo anti-B4 de control no mostró la inhibición de la autofosforilación del receptor del IGF-I estimulada por el IGF-I. En cambio, se obtuvo una inhibición completa de la autofosforilación del receptor del IGF-I estimulada por el IGF-I tras el tratamiento con el anticuerpo EM164 (figura 4).

25 Para demostrar la inhibición de la fosforilación del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1), se utilizó un ELISA con el anticuerpo anti-IRS-1 inmovilizado para capturar el IRS-1 de los lisados, seguido de la medición de la subunidad p85 asociada de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3-K) que se fija al IRS-1 fosforilado (Jackson, J. G. et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 9994-10003). En la figura 5, se trataron las células MCF-7 con el anticuerpo (EM164 o IR3) a 5 µg/ml en medio sin suero durante 2 horas, seguido de la estimulación con IGF-I a 50 ng/ml durante 10 min a 37°C. El anticuerpo anti-IRS-1 (policlonal de conejo; Upstate Biotechnology) se capturó indirectamente mediante incubación en una placa de ELISA recubierta con anticuerpo de cabra contra IgG de conejo que, luego, se utilizó para capturar el IRS-1 de las muestras de lisados celulares mediante la incubación durante una noche a 4°C. A continuación se incubaron los pocillos con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-p85-PI-3-K (Upstate Biotechnology) durante 4 h, seguido del tratamiento con el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP durante 30 min. Los pocillos se lavaron entonces y se realizó la detección con el sustrato ABTS/H₂O₂ (figura 5). Como se muestra en la figura 5, el anticuerpo EM164 fue más eficaz a la hora de inhibir la fosforilación del IRS-1 estimulada por el IGF-I que el anticuerpo IR3, y el anticuerpo EM164 no mostró ninguna actividad agonista de la fosforilación del IRS-1 cuando se incubó con células en ausencia del IGF-I.

40 La activación de otros efectores vía abajo, tales como Akt y Erk1/2, también se vio inhibida por el anticuerpo EM164 de un modo dependiente de la dosis en las células SaOS-2 (figura 6) y en las células MCF-7, como se demostró con los análisis de inmunotransferencia de los lisados y anticuerpos específicos de la fosforilación (anticuerpos policlonales de conejo anti-fosfo-Ser473 de Akt y anti-fosfo-ERK1/2; Tecnología de señalización celular). El anticuerpo pan-ERK mostró que se había cargado la misma cantidad de proteínas en todos los carriles (figura 6). El tratamiento de las células SaOS-2 con el anticuerpo EM164 no inhibió la fosforilación de Erk1/2 estimulada por el EGF, lo que demuestra que el anticuerpo EM164 inhibe específicamente la vía de señalización del receptor del IGF-I.

E. Inhibición, debida al anticuerpo EM164, del crecimiento y la supervivencia de las células tumorales humanas estimulados por IGF-I, por IGF-II- y por suero.

50 **[0026]** Se analizó la respuesta al crecimiento y la supervivencia al IGF-I de varias estirpes celulares tumorales humanas en condiciones libres de suero. Estas estirpes celulares se trataron con el anticuerpo EM164 en presencia del IGF-I, del IGF-II, o de suero, y se midieron sus respuestas de crecimiento y de supervivencia mediante un ensayo de MTT después de 2 a 4 días. Se sembraron aproximadamente 1500 células en una placa de 96 pocillos en medio regular con suero, que se reemplazó con medio sin suero al día siguiente (bien medio RPMI sin suero complementado con transferrina y SAB, o bien medio sin rojo fenol como está especificado en Dufourmy, B. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171). Después de un día de crecimiento en medio sin suero, se incubaron las células con aproximadamente 75 µl de anticuerpo a 10 µg/ml durante 30 min a 3 h, seguido de la adición de 25 µl de una solución de IGF-I (o IGF-II o suero) para obtener una concentración final de IGF-I a 10 ng/ml, o IGF-II a 20 ng/ml, o suero al 0,04-10%. En algunos experimentos se estimularon primero las células con IGF-I durante 15 min antes de añadir el anticuerpo EM164, o se añadieron juntos el anticuerpo EM164 e IGF-I. A continuación se dejaron crecer las células durante otros 2 y 3 días. Una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5)-dimetiltiliazol-2-il)-2,5-

5

difeniltetrazolio; 25 µl de una solución a 5 mg/ml en PBS) se añadió entonces y las células se devolvieron al incubador durante 2-3 h. Después se retiró el medio y se reemplazó por 100 µl de DMSO, se mezcló y se midió la absorbancia de la placa a 545 nm. Varias estirpes celulares tumorales humanas mostraron una respuesta de crecimiento y de supervivencia tras la adición del IGF-I o del IGF-II o de suero que se inhibió significativamente por el anticuerpo EM164, independientemente de si el anticuerpo se añadía antes que el IGF-I, o si se añadía el IGF-I antes que el anticuerpo, o que si se añadían a la vez el IGF-I y el anticuerpo.

TABLA 1. Inhibición, debida al anticuerpo EM164, del crecimiento y la supervivencia estimulados por IGF-I en las células tumorales.

Tipo de células tumorales	Veces de respuesta del crecimiento al IGF-I (ensayo de MTT: proporción para las células tratadas con IGF-I frente a células sin tratar en medio sin suero) ^a	Porcentaje de inhibición, debida al anticuerpo EM164, del crecimiento estimulado por el IGF-I en medio sin suero	Inhibición, debida al anticuerpo EM164, del crecimiento/supervivencia de las células en suero al 1,25-10% ^b
MCF-7 (mama)	1,7-2,8	100%	85%
HT-3 (cervical)	2	70-90 %	ND
Colo 205 (colon)	2,3	50%	Sí
HT-29	1,5	60%	Sí
NCI-H838 (pulmón)	3	100%	85-90 %
Calu-6	1,6-1,8	85%	Sí
SK-LU-1	1,4	100%	No
NCI-H596	1,4	100%	Semanalmente
A 549	1,2	80%	ND
A 375 (melanoma)	1,6	90%	No
SK-Mel-37	1,4	85%	ND
RD (rabdomyosarcoma)	1,7	85-100 %	Sí
SaOS-2 (osteosarcoma)	2,5	100%	Sí
A 431 (epidermoide)	2,2	85%	Sí
SK-N-SH (neuroblastoma)	2	85%	30-50 %

^a Ensayo de MTT de la supervivencia/crecimiento durante 3 a 4 días de las células en respuesta al IGF-I a 10 ng/ml en medio sin suero que contiene el anticuerpo EM164 a 50-10 µg/ml.

^b Inhibición del crecimiento de las células en suero al 1,25-10% en presencia del anticuerpo EM164 a 5-10 µg/ml mediante el ensayo de MTT o el ensayo de formación de colonias basándose en la comparación con el control (con suero pero sin anticuerpo); el grado de inhibición se midió cuantitativamente para las células MCF-7, NCI-H838 y SK-N-SH basándose en los controles (sin suero pero con anticuerpo, y con suero pero sin anticuerpo) para dar cuenta de la estimulación de las células por el IGF autocrino/paracrino. ND indica que no hay datos o que son malos debido a las dificultades de tinción.

El anticuerpo EM164 inhibió intensamente el crecimiento y la supervivencia, estimulados por el suero o por el IGF-I, de las células de cáncer de mama MCF-7 (figuras 7 y 8). En un experimento independiente, el anticuerpo EM164 inhibió intensamente el crecimiento y la supervivencia, estimulados por el IGF-II, de las células MCF-7. Los informes anteriores que utilizaron anticuerpos disponibles comercialmente, tales como el anticuerpo IR3, mostraron una débil inhibición del crecimiento y la supervivencia, estimulados por el suero, de las células MCF-7, como se confirmó en la figura 7 para los anticuerpos IR3 y 1H7 (Cullen, K. J. et al., 1990, Cancer Res., 50, 48-53). En cambio, el anticuerpo EM164 era un potente inhibidor del crecimiento, estimulado por suero o por IGF, de las células MCF-7. Como se muestra en la figura 8, el anticuerpo EM164 fue igualmente eficaz a la hora de inhibir el crecimiento y la supervivencia de las células MCF-7 a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones de suero (suero al 0,04-10%).

La inhibición del crecimiento de las células MCF-7 mediada por el anticuerpo EM164 se midió mediante recuento de células. De esta forma, en una placa de 12 pocillos, se sembraron aproximadamente 7500 células en medio RPMI con SBF al 10%, en presencia o ausencia del anticuerpo EM164 a 10 µg/ml. Después de 5 días de crecimiento, el recuento de células para la muestra de control sin tratar fue de 20,5 x 10⁴ células, a diferencia de un recuento celular de sólo 1,7 x 10⁴ células para la muestra tratada con el anticuerpo EM164. El tratamiento con el anticuerpo EM164 inhibió el crecimiento de las células MCF-7 unas 12 veces en 5 días. Esta inhibición por el anticuerpo EM164 fue significativamente mayor de lo que lo fue una inhibición de 2,5 veces descrita utilizando el anticuerpo IR3 en un ensayo de 6 días para las células MCF-7 (Rohlik, Q. T. et al., 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 276-281).

El crecimiento y la supervivencia, estimulados por suero y por el IGF-I, de una estirpe celular de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H838 también se vieron muy inhibidos por el anticuerpo EM164, en comparación con un anticuerpo anti-B4 de control (figura 9). El tratamiento con el anticuerpo EM164 en medio sin suero produjo una señal más pequeña que la muestra sin tratar para las células NCI-H838 y MCF-7, supuestamente porque el anticuerpo EM164 también inhibió la estimulación del IGF-I e IGF-II autocrinos y paracrinos de estas células (figuras 7 y 9). El tamaño de las colonias de las células de cáncer de colon HT29 también se redujo enormemente tras el tratamiento con el anticuerpo EM164.

Por consiguiente, el anticuerpo EM164 es único entre todos los anticuerpos contra el receptor del IGF-I por su eficacia para inhibir el crecimiento, estimulado por el suero, de las células tumorales tales como las células MCF-7 y NCI-H833 en más del 80%.

El anticuerpo EM164 ocasionó una detención del crecimiento de las células en la fase G0/G1 del ciclo celular y anuló el efecto mitógeno del IGF-I. Para el análisis del ciclo celular, las células MCF-7 se trataron con el IGF-I (20 ng/ml) en presencia o ausencia del EM164 (20 ng/ml) durante 1 día y entonces se analizaron por tinción de yoduro de propidio y citometría de flujo. Como se muestra en la figura 25, el paso de las células por las distintas fases del ciclo celular en respuesta a la estimulación del IGF-I en ausencia del EM164 (el 41% de células estaba en la fase S y el 50% estaba en la fase G0/G1) quedó suprimido en las células tratadas con el EM164 (solo el 9% estaba en la fase S y el 77% de las células estaba en la fase G0/G1).

[0027] Además de la inhibición de la proliferación celular, el tratamiento con el anticuerpo EM164 dio lugar a la apoptosis de las células. Para la medición de la apoptosis, se midió la escisión de la proteína CK18 citoqueratina por la caspasa en las células de cáncer de pulmón NCI-H838 incubadas con el IGF-I o con suero en presencia o ausencia de EM164 durante 1 día (figura 26). En ausencia de EM164, la adición de IGF-I o de suero dio lugar a una señal de CK18 escindida por la caspasa más baja en comparación con el control sin IGF-I, lo que indica que el IGF-I y el suero impiden la activación de la caspasa. El tratamiento con el EM164 suprimió los efectos antiapoptóticos del IGF-I y del suero, como se indicó por una mayor presencia de CK18 escindida en presencia de EM164 que en ausencia de EM164 (figura 26).

F. Inhibición sinérgica, debida al anticuerpo EM164, del crecimiento y de la supervivencia de células tumorales humanas en politerapia con otros citotóxicos y citostáticos

La administración en politerapia del anticuerpo EM164 con el taxol produjo una inhibición significativamente superior del crecimiento y la supervivencia de las células Calu6 de cáncer de pulmón no microcítico que el taxol en monoterapia. De igual forma, la politerapia del anticuerpo EM164 con la camptotecina produjo una inhibición significativamente superior que la monoterapia de camptotecina en relación con el crecimiento y la supervivencia de las células HT29 de cáncer de colon. Ya que no se esperaba que la monoterapia con el anticuerpo EM164 fuera tan tóxica para las células como los fármacos quimioterápicos orgánicos, la sinergia entre el efecto predominantemente citostático del anticuerpo EM164 y el efecto citotóxico del fármaco quimioterápico puede ser realmente muy eficaz en las politerapias contra el cáncer en el ámbito clínico.

El efecto combinado del anticuerpo EM164 con el anticuerpo contra el receptor del EGF (KS77) produjo una inhibición significativamente superior que el anticuerpo EM164 o el anticuerpo KS77 en monoterapia sobre el crecimiento y la supervivencia de varias estirpes celulares tumorales, tales como las células HT-3, las células RD, las células MCF-7 y las células A431. Por consiguiente, el efecto sinérgico de la politerapia con anticuerpos

neutralizantes de dos receptores de factores de crecimiento tales como el receptor del IGF-I y el receptor del EGF también puede ser útil en el tratamiento clínico del cáncer.

[0028] Los conjugados del anticuerpo EM164 con fármacos citotóxicos también son valiosos para la administración dirigida de los fármacos citotóxicos a los tumores que sobreexpresan el receptor del IGF-I. Los conjugados del anticuerpo EM164 con radiomarcadores u otras marcaciones se pueden utilizar en el tratamiento y el diagnóstico de imagen de los tumores que sobreexpresan el receptor del IGF-I.

G. Efecto del tratamiento con el EM164, como monoterapia o en politerapia con antineoplásicos, en xenoinjertos de cáncer humano en ratones inmunodeficientes

Se implantaron xenoinjertos Calu-6 del cáncer de pulmón no microcítico humano en ratones inmunodeficientes mediante inyecciones subcutáneas de 1×10^7 células Calu-6. Como se muestra en la figura 10, estos ratones que contienen xenoinjertos Calu-6 de 100 mm³ se trataron con monoterapia de anticuerpo EM164 (6 inyecciones de 0,8 mg/ratón, i.v. dos veces por semana) o con monoterapia de taxol (cinco inyecciones de taxol, i.p. cada dos días; 15 mg/kg), o con la politerapia de taxol y anticuerpo EM164, o con monoterapia de PBS (200 µl/ratón, 6 inyecciones, dos veces por semana, i.v.) utilizando cinco ratones por grupo de tratamiento. El crecimiento de los tumores se redujo significativamente con el tratamiento con el anticuerpo EM164 en comparación con un control de PBS. No se observó ninguna toxicidad del anticuerpo EM164, basándose en las mediciones del peso de los ratones. Aunque la monoterapia con taxol fue eficaz hasta el día 14, el tumor comenzó a crecer posteriormente. Sin embargo, se retrasó significativamente el crecimiento del tumor en el grupo que se trató con una politerapia de taxol y anticuerpo EM164, en comparación con el grupo que se trató con monoterapia de taxol.

[0029] Se implantaron xenoinjertos de cáncer de páncreas humano en ratones hembra SCID/ICR de 5 semanas (Taconic) mediante inyecciones subcutáneas de 10⁷ células BxPC-3 en PBS (día 0). A continuación, los ratones que llevaban tumores establecidos de 80 mm³ se trataron con monoterapia de EM164 (13 inyecciones de 0,8 mg/ratón, i.v., vena lateral de la cola, los días 12, 16, 19, 23, 26, 29, 36, 43, 50, 54, 58, 61 y 64), con monoterapia de gemcitabina (dos inyecciones de 150 (mg/kg)/ratón), i.p., los días 12 y 19), con una politerapia de gemcitabina y EM164 siguiendo la planificación de más arriba, monoterapia de PBS, y una monoterapia con anticuerpo de control (siguiendo la misma planificación que para el EM164) con cinco ratones hembra en cada uno de los cinco grupos de tratamiento. Como se muestra en la figura 27, la monoterapia con EM164, o en politerapia con la gemcitabina, dio lugar inicialmente a la regresión total de los xenoinjertos tumorales en 4 de los 5 animales del grupo de tratamiento con el EM164, y en los 5 animales del grupo de la politerapia. El recrecimiento tumoral mensurable sólo se observó en más de un animal el día 43 en el grupo con el EM164 y en el día 68 en el grupo de la politerapia, lo que dio lugar a un volumen tumoral medio significativamente más pequeño el día 74 en comparación con los tratamientos de control ($P = 0,029$ y $0,002$, respectivamente; prueba de t de Student de dos colas; figura 27). En otro estudio, el tratamiento con el anticuerpo EM164 (solo o en combinación con el anticuerpo contra el receptor del EGF; inyecciones intraperitoneales) inhibió el crecimiento de los xenoinjertos BxPC-3 establecidos en los ratones.

H. Clonación y secuenciación de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo EM164

Se purificó el ARN total de las células de hibridoma del EM164. Se realizaron retrotranscripciones con 4 a 5 µg de ARN total o bien oligo-dT o bien cebadores hexaméricos aleatorios.

Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el método RACE descrito en Co et al. (J. Immunol., 148, 1149-1154 (1992)) y utilizando cebadores degenerados como está descrito en Wang et al., (J. Immunol. Methods, 233, 167-177 (2000)). El método de PCR RACE requirió una etapa intermedia para añadir una cola de poli-G en los extremos 3' de la primera cadena del ADNc. Las reacciones se purificaron con columnas Qiagen (Qiagen) y se eluyeron en 50 µl de tampón NEB 4 a 1X. Se realizó una reacción de adición de cola de dG en lo eluido con CoCl₂ a 0,25 mM, dGTP a 1 mM y 5 unidades de transferasa terminal (NEB), en tampón NEB 4 a 1X. Se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos y luego se añadió 1/5 de la reacción (10 µl) directamente a la reacción de PCR para servir de ADN de molde.

Las reacciones de PCR degeneradas y de RACE eran idénticas, salvo por las diferencias en los cebadores y el molde. Se utilizó la reacción de la transferasa terminal directamente para el molde de la PCR de la RACE, mientras que la mezcla de reacción de la RT se utilizó directamente para las reacciones de PCR degeneradas.

En ambas reacciones de PCR, la degenerada y la RACE, se utilizó el mismo cebador de cadena ligera en 3': HindKL - tatagagctcaagcttgatggtggaagatggatacagttggtgc (SEQ ID n.º: 14) y el cebador de cadena pesada en 3':

Bg12lgG1 - ggaagatctatagacagatgggggtgctgtttggc (SEQ ID n.º 15).

En la PCR RACE se utilizó un cebador poli-C en 5' para la cadena ligera y para la pesada:

EcoPolyC - TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID n.º: 16),

mientras que los cebadores en 5' para la PCR degenerada eran:

Sac1MK - GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID n.º: 17)

para la cadena ligera, y una mezcla igual de:

EcoR1MH1 - CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID n.º: 18) y

EcoR1MH2 - CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID n.º: 19)

5 para la cadena pesada.

En las secuencias de los cebadores anteriores, las bases degeneradas se definen como sigue: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K = G+T, M=A+C, R=A+g, W=A+T, V = A+C+G.

10 Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el programa siguiente: 1) 94 °C 3 min, 2) 94 °C 15 s, 3) 45 °C 1 min, 4) 72 °C 2 min, 5) ciclo de vuelta a la etapa n.º 2 29 veces, 6) se acaba con una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min.

Se clonaron los productos de la PCR en pBluescript II SK+ (Stratagene) utilizando las enzimas de restricción creadas por los cebadores de la PCR.

15 Se secuenciaron varios clones independientes de la cadena ligera y de la pesada mediante medios convencionales para identificar y evitar posibles errores de secuencia generados por la polimerasa (figuras 12 y 13). Con las definiciones de clasificación canónica de Chothia, se identificaron tres CDR de cadena ligera y pesada (figuras 12-14).

20 Una búsqueda en la base de datos IgBlast del NCBI indicó que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo contra el receptor del IGF-I probablemente procediera del gen Cr1 de IgVk de las células reproductoras de ratón, mientras que la región variable de la cadena pesada probablemente procedía del gen J558.c de IgVh de las células reproductoras (figura 15).

25 Se secuenció la proteína del anticuerpo murino EM164 para confirmar las secuencias mostradas en las figuras 12 y 13. Las bandas de proteína de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo purificado EM164 se transfirieron a una membrana de PVDF desde un gel (de acrilamida con SDS en condiciones reductoras), se cortaron de la membrana de PVDF y se analizaron mediante secuenciación de proteínas. La secuencia del extremo amino de la cadena ligera se determinó, mediante secuenciación de Edman, que era: DVLMTQTPLS (SEQ ID n.º: 20), que coincide con la secuencia del extremo amino del gen de cadena ligera clonado que se obtuvo del hibridoma de EM164.

30 **[0030]** Se encontró que el extremo amino de la cadena pesada estaba bloqueado para la secuenciación de proteínas de Edman. Un fragmento peptídico de la digestión trípica de la cadena pesada de masa 1129.5 (M+H+, monoisotópico) se dividió en subfragmentos mediante descomposición metaestable (PSD) y se determinó que su secuencia era GRPDYYGSSK (SEQ ID n.º: 21). Otro fragmento peptídico de digestión trípica de la cadena pesada de masa 2664.2 (M+H+, monoisotópico) también se subfragmentó mediante descomposición metaestable (PSD) y se determinó que su secuencia era: SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFAR (SEQ ID m.º: 21). Ambas secuencias se correspondían perfectamente con las de la CDR3 y el marco 3 (FR3) del gen de la cadena pesada clonado a partir del hibridoma del EM164.

35 **I. Expresión recombinante del anticuerpo EM164**

40 **[0031]** Se clonaron las secuencias emparejadas de cadena ligera y pesada en un único vector de expresión de mamíferos (figura 16). Los cebadores de la PCR para las secuencias variables humanas crearon sitios de restricción que permitieron que la secuencia señal humana se uniera al vector de clonación pBluescriptII, y se clonaron las secuencias variables en el plásmido de expresión de mamíferos mediante los sitios EcoRI y BsiWI o HindIII y Apal para la cadena ligera o la pesada, respectivamente (figura 16). Se clonaron las secuencias variables de la cadena ligera en fase con la región constante de la IgK humana, y se clonaron las secuencias variables de la cadena pesada en la secuencia de la región constante IgL humana. En los plásmidos de expresión finales, los promotores CMV humanos dirigieron la expresión de ambas secuencias de ADNc, la cadena ligera y la pesada. La expresión y la purificación del anticuerpo EM164 recombinante de ratón se realizaron según los métodos que se conocen bien en la técnica.

Ejemplo 2: Versiones humanizadas del anticuerpo EM164

La remodelación de la superficie del anticuerpo EM164 para proporcionar versiones humanizadas adecuadas como agentes terapéuticos o diagnósticos generalmente se realiza según los principios y los métodos descritos en la patente de los EE.UU. n.º 5.639.641 y es como sigue.

50

A. Predicción de la superficie

La accesibilidad al solvente de los restos de la región variable para un conjunto de anticuerpos con estructuras resueltas se utilizó para predecir los restos de superficie para una región variable del anticuerpo murino (EM164) contra el receptor del IGF-I. La accesibilidad de los aminoácidos al solvente para un conjunto de 127 ficheros de estructuras de anticuerpos únicos (tabla 2) se calculó con el programa informático MC (Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol., 235, 959-973). Se determinaron las diez secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada más parecidas de este conjunto de 127 estructuras mediante el alineamiento de las secuencias. Se calculó la accesibilidad media a los solventes para cada resto de la región variable, y las posiciones con una accesibilidad media de más del 30% se consideró que serían restos de superficie. Las posiciones con una accesibilidad media de entre el 25% y el 35% se examinaron adicionalmente mediante el cálculo de la accesibilidad de cada resto sólo para las estructuras con dos restos flanqueantes idénticos.

TABLA 2: 127 estructuras de anticuerpos de la base de datos de Brookhaven utilizados para predecir la superficie del anticuerpo contra el receptor del IGF-I (EM164)

Los 127 ficheros de estructuras de Brookhaven utilizados para predicciones de superficie									
2rcs	3hfl	3hf	1aif	1a3r	1bbj	43c9	4fab	6fab	7fab
		m							
2gfb	2h1p	2hfl	1a6t	1axt	1bog	2hrp	2jel	2mc	2pcp
								p	
1yuh	2bfv	2cgr	8fab	1ae6	1bvl	2dbl	2f19	2fb4	2fbj
1sm	1tet	1vfa	glb2	1a4j	1cly	1vge	1yec	1yed	1yee
3									
1nsn	1opg	1osp	1aj7	1ayl	1clz	1plg	1psk	1rmf	1sbs
1ncd	1nfd	1ngp	1acy	1afv	1cbv	1nld	1nm	1nm	1nqb
							a	b	
1mc	1mf	1mi	15c8	1a5f	1axs	1mlb	1mp	1nbv	1ncb
p	b	m					a		
1jrh	1kb5	1kel	1ap2	1b2	1adq	1kip	1kir	1lve	1mam
			w						
1igi	1igm	1igt	1ad0	1baf	1cfv	1igy	1ikf	1jel	1jhl
1gpo	1hil	1hyx	1a0q	1bjm	1clo	1iai	1ibg	1igc	1igf
1fpt	1frg	1fvc	1aqk	1bln	1d5	1gaf	1ggi	1ghf	1gig
					b				
1fai	1fbi	1fdl	1ad9	1bbd	1f58	1fgv	1fig	1flr	1for
	1dbl	1dfb	1a3l	1bfo	1eap	1dsf	1dvf		

B. Modelización molecular:

Se generó un modelo molecular del EM164 murino utilizando el programa informático AbM de Oxford Molecular. Se construyó el marco de los anticuerpos a partir de los ficheros de estructura para los anticuerpos con las secuencias de aminoácidos más similares, que eran 2jel para la cadena ligera y 1nqb para la cadena pesada. Se construyeron las CDR no canónicas buscando en una base de datos de estructuras C- α que contiene estructuras resueltas no redundantes. Se determinaron los restos que aparecen a menos de 5 Å de una CDR.

C. Selección del Ac humano

Se compararon las posiciones de superficie del EM164 murino con las posiciones correspondientes en las secuencias de anticuerpos humanos en la base de datos de Kabat (Johnson, G. y Wu, T. T. (2001) Nucleic Acids Research, 29: 205-206). Se utilizó el programa SR (Searle 1998) de gestión de bases de datos de anticuerpos para extraer y alinear los restos de superficie de los anticuerpos de las parejas de cadenas pesada y ligera naturales de anticuerpos humanos. Para reemplazar los restos de superficie del anticuerpo murino contra el receptor del IGF-I se eligió la superficie de anticuerpo humano con los restos de superficie más idénticos, prestando una especial atención a las posiciones que se encuentran a menos de 5 Å de una CDR.

D. Mutagénesis mediante PCR

La mutagénesis mediante PCR se realizó en el clon del ADNc del EM164 murino (véase más arriba) para construir el EM164 humano con la superficie remodelada (en la presente memoria, huEM164). Se diseñaron conjuntos de cebadores para realizar los 8 cambios de aminoácido requeridos para todas las versiones probadas del huEM164, y se diseñaron más cebadores para construir alternativamente los dos cambios de 5 residuos (tabla 3). Se realizaron las reacciones de PCR con el programa siguiente: 1) 94 °C 1 min, 2) 94 °C 15 s, 3) 55 °C 1 min, 4) 72 °C 1 min, 5) ciclo de vuelta a la etapa n.º 2, 29 veces, 6) se acaba con la etapa de extensión final a 72 °C durante 4 minutos. Se digirieron los productos de la PCR con sus correspondientes enzimas de restricción y se clonaron en los vectores de clonación pBluescript como se describió más arriba. Se secuenciaron los clones para confirmar los cambios de aminoácido deseados.

TABLA 3: Cebadores de PCR utilizados para construir 4 anticuerpos EM164 humanizados.

Cebador	Secuencia	SEQ ID n.º
Em164hcvv	CAGGTGTACACTCCAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGG CTGAAGTGGTGAAGCCTG	23
Em164hcqqgol1	CAATCAGAAGTTCCAGGGGAAGGCCACAC	24
Em164hcqqgol2	CCTCCCCTGGAAGTCTGATTGTAGTTAGTACG	25
Em1641cv3	CAGGTGTACACTCCGATGTTGTGATGACCCAACTCC	26
Em1641cl3	CAGGTGTACACTCCGATGTTTTGATGACCCAACTCC	27
Em1641cp18	GACTAGATCTGCAAGAGATGGAGGCTGGATCTCCAAGAC	28
Em1641cbg12	TTGCAGATCTAGTCAGAGCATAGTACATAGTAATG	29
Em164r45	GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGGCTC CTGATCTAC	30
Em164a67ol1	GTGGCAGTGGAGCAGGGACAGATTTTAC	31
Em164a67ol2	GAAATCTGTCCCTGCTCCACTGCGACTG	32

E. Restos de la superficie de la región variable

Las técnicas de remodelación de la superficie de anticuerpos descritas por Pedersen et al. (J. Mol. Biol., 235, 959-973, 1994) y Roguska et al. (Protein Eng., 9, 895-904, 1996) comienzan con la predicción de los restos de superficie de las secuencias variables del anticuerpo murino. Un «resto de superficie» se define como un aminoácido que tiene al menos el 30% del área total de su superficie accesible a una molécula de agua.

Se identificaron los 10 anticuerpos más homólogos en el conjunto de 127 ficheros de estructura de anticuerpos (figuras 17 y 18). Se promedió la accesibilidad del disolvente para cada posición de Kabat de estas secuencias alienadas y la distribución de la accesibilidad relativa de cada resto fue la que se muestra en la figura 19. Tanto la cadena ligera como la pesada tienen 26 restos con una accesibilidad relativa media de al menos el 30% (figura 19): estos restos fueron, por lo tanto, los restos de superficie predichos para el EM164. Varios restos tuvieron una accesibilidad media de entre el 25% y el 35%, y éstas se examinaron además promediando sólo los anticuerpos con dos restos idénticos flanqueando cada lado del resto (tablas 4 y 5). Después de este análisis adicional, el conjunto original de restos de superficie que se identificó más arriba permaneció sin cambios.

TABLA 4: Restos de superficie y accesibilidad media (acc. media) para las secuencias variables de la cadena ligera y la pesada del anticuerpo EM164

Restos de superficie del EM164					
Cadena ligera			Cadena pesada		
EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media	EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media
D	1	45,89	Q	1	58,19
L	3	41,53	Q	3	34,08
T	7	31,40	Q	5	34,36
L	9	50,08	A	9	38,01
L	15	35,45	L	11	47,72

Restos de superficie del EM164					
Cadena ligera			Cadena pesada		
EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media	EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media
Q	18	39,79	K	13	46,51
R	24	34,36	P	14	31,49
S	26	32,63	G	15	31,42
Q	27	34,35	K	19	34,41
N	28	36,38	K	23	31,23
P	40	43,05	T	28	36,24
G	41	46,56	P	41	44,01
Q	42	34,92	G	42	42,62
K	45	30,58	Q	43	46,85
S	52	30,40	E	61	46,68
S	56	41,46	K	62	44,87
G	57	42,41	K	64	38,92
D	60	45,96	R	65	40,06
S	67	38,20	K	73	35,92
R	77	42,61	S	74	48,91
E	81	38,46	S	82B	32,72
V	95E	34,83	S	84	35,21
K	103	31,10	E	85	39,62
K	107	36,94	D	98	36,00
R	108	60,13	A	106	37,65
A	109	53,65	S	113	43,42

Tabla 5

Restos de superficie limítrofes					
Cadena ligera			Cadena pesada		
EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media	EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media
T	5	28,68	Q	3	31,62
T	7	30,24	Q	5	36,07
P	12	26,59	P	14	29,88
G	16	25,20	G	15	30,87
D	17	25,73	S	17	25,64
S	20	25,37	K	19	35,06
R	24	36,73	K	23	31,48
S	26	31,00	G	26	30,53
Q	27	32,29	S	31	27,12
S	27A	29,78	R	56	Na
V	27C	29,05	T	68	27,71
V	29	na	T	70	24,65
Q	42	34,92	S	75	18,80

Restos de superficie limítrofes					
Cadena ligera			Cadena pesada		
EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media	EM164	Kabat n.º	Accesibilidad media
K	45	32,24	S	82B	32,87
S	52	30,02	P	97	Na
R	54	29,50	Y	99	Na
D	70	26,03	V	103	Na
R	74	na	T	111	25,95
E	79	26,64			
A	80	29,61			
V	95E	42,12			
G	100	29,82			
K	103	31,10			
E	105	25,78			

Los restos que habían tenido una accesibilidad media de entre el 25% y el 35% se analizaron adicionalmente mediante el promedio de un subconjunto de anticuerpos que tenían dos restos idénticos flanqueando cada lado del resto en cuestión. Se ofrecen estas posiciones limítrofes de superficie y su nueva accesibilidad media. Los 'na' se refieren a los restos sin restos flanqueantes idénticos en los 10 anticuerpos más similares.

F. Modelización molecular para determinar qué residuos se encuentran a menos de 5 Å de una CDR

[0032] El modelo molecular de más arriba, generado con el paquete de programas AbM, se analizó para determinar qué restos de la superficie del EM164 estaban a menos de 5 Å de una CDR. Para remodelar la superficie del anticuerpo murino EM164, todos los restos de superficie fuera de una CDR se deben cambiar a la del homólogo humano, pero los restos a menos de 5 Å de una CDR se tratan con un cuidado especial porque también pueden contribuir a la especificidad del antígeno. Por consiguiente, estos últimos restos se deben identificar y considerar cuidadosamente durante todo el procedimiento de humanización. Las definiciones de las CDR utilizadas para remodelar la superficie combinan la definición del AbM para la CDR2 de la cadena pesada y las definiciones de Kabat para las 5 CDR restantes (figura 14). La tabla 6 muestra los restos que estaban a menos de 5 Å de un resto Y de CDR en la secuencia de cadena pesada o de la ligera del modelo de EM164.

TABLA 6: Restos de superficie del marco del anticuerpo EM164 a menos de 5 Å de una CDR

Restos de superficie del EM164 a menos de 5 Å de una CDR	
Cadena ligera	Cadena pesada
D1	T28
L3	K73
T7	S74
P40	
Q42	
K45	
G57	
D60	
E81	

G. Identificación de las superficies humanas más homólogas

Se identificaron las superficies candidatas de anticuerpos humanos para remodelar la superficie del EM164 dentro de la base de datos de secuencias de anticuerpos de Kabat utilizando el programa SR, que hace posible la búsqueda sólo de posiciones de restos especificados contra la base de datos de los anticuerpos. Para preservar las parejas naturales, se compararon juntos los restos de superficie de las cadenas ligera y pesada. Las superficies humanas con mayor homología de la base de datos de Kabat se alinearon clasificadas por la identidad de secuencia. Las 5 mejores superficies se ofrecen en la tabla 7. A continuación, estas superficies se compararon para identificar cuáles requerirían menos cambios a menos de 5 Å de una CDR. El anticuerpo de linfocito B leucémico, CLL 1.69, requirió el menor número de cambios de restos de superficie (10 en total) y sólo dos de estos restos se encontraban a menos de 5 Å de una CDR.

También se alineó la secuencia completa de la región variable del EM164 contra la base de datos de anticuerpos humanos de Kabat y, de nuevo, se identificó que el CLL 1,69 era la secuencia de la región variable humana más parecida. Juntas, estas comparaciones de secuencias identificaron que el anticuerpo de linfocito B leucémico humano CLL 1.69 era la elección preferida como una superficie humana para el EM164.

Tabla 7: Las 5 mejores secuencias humanas extraídas de la base de datos Kabat

Las 5 superficies de anticuerpo humano más homólogas		
Anticuerpo	Cadena ligera	SEQ ID NO:
MuEM164	D L T L L Q P G Q K G D S R E K K R A	33
CLL1.69	D V T L L P P G Q R G D A R E K K R -	34
MSL5	D Q S L I P P G Q K G D S R D K K R A	35
CDP571	D M S S V R P G Q K G S S S D K K R -	36
LC3aPB	E V S G P R P G Q R G D S R E K K R -	37
SSbPB	E V S G P R P G Q R G D S R E K K R -	38
Anticuerpo	Cadena pesada	SEQ ID NO:
MuEM164	Q Q Q A L K P G K K T P G Q E K K R K S S S E A S	39
CLL1.69	Q Q V A V K P G K K T P G Q Q K Q G K S S S E Q S	40
MSL5	Q Q Q P L K P G K K T P G K D D K G T S N N E Q S	41
CDP571	Q Q V A V K P G K K T P G Q Q K K G K S S S E Q S	42
LC3aPB	- Q V A V K P G K K T P G Q Q K Q G K S S S E Q S	43
SSbPB	- Q V A V K P G K K T P G Q Q K Q G E S S S E Q S	44

Los alineamientos se generaron con SR (Pedersen, 1993). Se han subrayado los restos de superficie de EM164 que se encuentran a menos de 5 Å de una CDR.

H. Construcción de los genes del EM164 humanizado

Los diez cambios de restos de superficie para el EM164 (tabla 7) se realizaron mediante las técnicas de mutagénesis por PCR como está descrito más arriba. Como 8 de los restos de superficie del CLL 1.69 no estaban a menos de 5 Å de una CDR, se cambiaron estos restos de la versión murina a la humana en todas las versiones del EM164 humanizado (tablas 8 y 9). Los dos restos de superficie de la cadena ligera que se encontraban a menos de 5 Å de una CDR (posiciones de Kabat 3 y 45) se cambiaron a humanos o se conservaron como murinos. Juntas, estas opciones generan las cuatro versiones humanizadas del EM164 que se construyeron (figuras 22 y 23).

De las 4 versiones humanizadas, la versión 1.0 tiene los 10 restos de superficie humanos. La versión más conservadora con respecto a los cambios en la vecindad de la CDR es la versión 1.1, que conservó los dos restos de superficie murina que se encontraban a menos de 5 Å de una CDR. Los 4 genes del anticuerpo EM164 humanizado se clonaron en un plásmido de expresión de anticuerpos (figura 16) para utilización en transfecciones transitorias y estables.

Tabla 8: Residuos cambiados en las versiones 1.0-1.3 del anticuerpo EM164 humanizado

Cambios en todas las versiones						
Cadena ligera: muQ18 a huP18; muS67 a huA67						
Cadena pesada: muQ5 a huV5; muL11 a huV11; muE61 a huQ61; muK64 a huQ64; muR65 a huG65; muA106 a huQ106						
Cambios en huEM164						
	Cadena ligera aa3		Cadena ligera aa45		Total 5A	
	Mu	hu	mu	hu	Res. ratón	
v1.0		V		R	0	
v1.1	L		K		2	
v1.2	L			R	1	
v1.3		V	K		1	

I. Comparación de las afinidades de las versiones humanizadas del anticuerpo EM164 con el anticuerpo EM164 murino para la fijación al receptor completo del IGF-I y a la cadena α del receptor truncado del IGF-I.

Se comparó la afinidad de las versiones 1.0-1.3 del anticuerpo EM164 humanizado con la del anticuerpo EM164 murino mediante análisis de fijación competitiva con el receptor completo del IGF-I humano biotinilado o la cadena α del receptor del IGF-I truncado etiquetada con el epítipo myc, como se describió más arriba. Se obtuvieron muestras del anticuerpo EM164 humanizado mediante transfección transitoria de los vectores de expresión adecuados en las células 293T de riñón embrionario humano, y se determinó la concentración del anticuerpo mediante ELISA utilizando estándares para anticuerpos humanizados purificados. Para las mediciones de fijación competitiva por ELISA, las mezclas de muestras de anticuerpo humanizado y diferentes concentraciones del anticuerpo EM164 murino se incubaron con el receptor del IGF-I completo biotinilado capturado indirectamente o con la cadena α del receptor del IGF-I truncado etiquetada con el epítipo myc. Después de equilibrar, se detectó el anticuerpo humanizado fijado mediante un anticuerpo de cabra anti-Fab'2 humano conjugado a la peroxidasa de rábano picante. Para determinar las afinidades relativas de los anticuerpos humanizados y el murino se utilizaron gráficos de $([Ac\ murino\ fijado]/[Ac\ humanizado\ fijado])$ frente a $([Ac\ murino]/[Ac\ humanizado])$, que teóricamente producirían una línea recta con una pendiente = $(Kd\ de\ Ac\ humanizado/Kd\ de\ Ac\ murino)$.

En la figura 11 se muestra un ejemplo de ensayo de competición. Una placa de ELISA Immulon-2HB se revistió con 100 μ l de estreptavidina a 5 μ g/ml por pocillo en un tampón de carbonato a temperatura ambiente durante 7 horas. Los pocillos revestidos con estreptavidina se bloquearon con 200 μ l de tampón de bloqueo (SAB a 10 mg/ml en tampón TBS-T) durante 1 h, se lavaron con tampón TBS-T y se incubaron con el receptor del IGF-I biotinilado (5 ng por pocillo) durante una noche a 4°C. Los pocillos que contenían el receptor del IGF-I biotinilado capturado indirectamente se lavaron entonces y se incubaron con mezclas del anticuerpo EM164 humanizado (15,5 ng) y el anticuerpo murino (0 ng, o 16,35 ng, o 32,7 ng, o 65,4 ng, o 163,5 ng) en 100 μ l de tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente y después se incubaron durante una noche a 4 °C. A continuación se lavaron los pocillos con tampón TBS-T y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-Fab'2 humano conjugado a la peroxidasa de rábano picante durante 1 hora (100 μ l; 1 μ g/ml en tampón de bloqueo) seguido de lavados y la detección con el sustrato ABTS/H2O2 a 405 nm.

El gráfico de $([Ac\ murino\ fijado]/[Ac\ humanizado\ fijado])$ frente a $([Ac\ murino]/[Ac\ humanizado])$ produjo una línea recta ($r^2 = 0,996$) con una pendiente ($Kd\ de\ Ac\ humanizado/Kd\ de\ Ac\ murino$) de 0,52. Por lo tanto, la versión 1.0 del anticuerpo humanizado se fijó al receptor del IGF-I más estrechamente que el anticuerpo EM164 murino. Se obtuvieron valores parecidos para el gradiente, que iba de unos 0,5 a 0,8, para la competición de la fijación del anticuerpo EM164 murino frente a las versiones 1.0, 1.1, 1.2 y 1.3 de los anticuerpos EM164 humanizados al receptor del IGF-I completo o a la cadena α del receptor del IGF-I truncado, lo que indicó que todas las versiones humanizadas del anticuerpo EM164 tenían una afinidad parecida, y que todas eran mejores que la del anticuerpo EM164 murino del que procedían. Una versión quimérica del anticuerpo EM164 con una mutación 92F \rightarrow C en la cadena pesada mostró una pendiente de aproximadamente 3 en una fijación competitiva parecida con el anticuerpo EM164 murino, lo que indicó que el mutante 92F \rightarrow C del EM164 tenía una afinidad 3 veces más baja que el anticuerpo EM164 murino a la hora de fijarse al receptor del IGF-I. El anticuerpo EM164 v1.0 humanizado mostró una inhibición parecida del crecimiento y la supervivencia, estimulados por el IGF-I, de las células MCF-7 a la que

produjo el anticuerpo EM164 murino (figura 24). La inhibición debida al anticuerpo EM164 v 1.0 humanizado sobre el crecimiento y la supervivencia, estimulados por el suero, de las células MCF-7 fue similar a la inhibición debida al anticuerpo EM164 murino.

Tabla 9

Segmento	Cadena ligera	Cadena pesada
FR1	1-23 (con un resto ocasional en 0, y una deleción en 10 en las cadenas V _λ)	1-30 (con un resto ocasional en 0)
CDR1	24-34 (con unas posibles inserciones numeradas como 27A, B, C, D, E, F)	31-35 (con unas posibles inserciones numeradas como 35A, B)
FR2	35-49	36-49
CDR2	50-56	50-65 (con unas posibles inserciones numeradas como 52A, B, C)
FR3	57-88	66-94 (con unas posibles inserciones numeradas como 82A, B, C)
CDR3	89-97 (con unas posibles inserciones numeradas como 95A, B, C, D, E, F)	95-102 (con unas posibles inserciones numeradas como 100A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K)
FR4	98-107 (con una posible inserción numerada como 106A)	103-113

El sistema de numeración de Kabat se utiliza para los polipéptidos de la región variable de las cadenas ligera y pesada de las diferentes versiones del Ac EM164. Los restos de aminoácidos se agrupan en un marco (FR) y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) según la posición en la cadena polipeptídica.
Tomado de Kabat et al. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», quinta edición, 1991, publicación del NIH n.º 91-3242

5

J. Procedimiento para proporcionar anticuerpos mejorados contra el receptor del IGF-I comenzando desde las secuencias de anticuerpos murino y humanizados descritas en la presente memoria

10

Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico del anticuerpo EM164 contra el receptor del IGF-I y sus variantes humanizadas se utilizaron para desarrollar otros anticuerpos con mejores propiedades y que también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Tales propiedades mejoradas incluyen un aumento de la afinidad por el receptor del IGF-I. Varios estudios han examinado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en distintas posiciones en la secuencia de un anticuerpo, basándose en el conocimiento de la secuencia del anticuerpo primario, en sus propiedades tales como la fijación y el nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539).

15

20

En estos estudios, se han generado variantes del anticuerpo primario mediante el cambio de la secuencia de los genes de las cadenas ligera y pesada en las CDR1, CDR2, CDR3 o las regiones marco, mediante métodos tales como la mutagénesis específica de sitio mediada por oligonucleótidos, la mutagénesis de casete, la PCR propensa a errores, el barajado de ADN o las cepas mutadoras de E. coli (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, capítulo 16, págs. 277-291, en «Phage Display of Peptides and Proteins», Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos con los que se cambia la secuencia del anticuerpo primario han dado lugar, a través del uso de técnicas de detección selectiva estándares, a una mejora de la afinidad de tales anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628).

25

30

Con una estrategia dirigida parecida que consiste en cambiar uno o más restos de aminoácidos del anticuerpo, las secuencias de anticuerpos descritas en esta invención se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos contra el receptor del IGF-I con una actividad mejorada, tales como anticuerpos que tienen grupos adecuados tales como grupos amino o tioles libres en puntos de unión convenientes para la modificación covalente para uso, por ejemplo, en la unión de los agentes terapéuticos.

K. Sistema de expresión alternativo para los anticuerpos murinos contra el receptor del IGF-I quiméricos y de otro tipo

El anticuerpo contra el receptor del IGF-I murino también se expresó a partir de plásmidos de expresión de mamíferos parecidos a los utilizados para expresar el anticuerpo humanizado (véase más arriba). Se sabe que los plásmidos de expresión tienen regiones constantes murinas que incluyen las secuencias $\gamma 1$ de la cadena pesada y κ de la cadena ligera (McLean et al., 2000, Mol Immunol., 37, 837-845). Estos plásmidos se diseñaron para aceptar cualquier región variable del anticuerpo, tal como, por ejemplo, el anticuerpo murino contra el receptor del IGF-I, mediante una digestión de restricción simple y clonación. Solía ser necesaria otra PCR del anticuerpo contra el receptor del IGF-I para crear sitios de restricción compatibles con los del plásmido de expresión.

[0033] Un método alternativo para expresar el anticuerpo totalmente murino contra el receptor del IGF-I fue reemplazar las regiones constantes humanas en el plásmido de expresión quimérico del anticuerpo contra el receptor del IGF-I. Se construyó el plásmido de expresión quimérico (figura 16) utilizando casetes para las regiones variables y para las regiones constantes de la cadena ligera y de la cadena pesada. Como las secuencias variables del anticuerpo se clonaron en este plásmido de expresión mediante las digestiones de restricción, se utilizaron otras digestiones de restricción para clonar en cualquier secuencia de región constante. Se clonaron los ADNc de la cadena ligera κ y de la cadena pesada $\gamma 1$, por ejemplo, a partir de ARN de hibridoma murino, tal como el ARN descrito en la presente memoria para clonar las regiones variables del anticuerpo anti-IGF-I. De igual forma, se diseñaron cebadores adecuados a partir de las secuencias disponibles en la base de datos de Kabat (véase la tabla 10). Por ejemplo, se utilizó la RT-PCR para clonar las secuencias de la región constante y para crear los sitios de restricción necesarios para clonar estos fragmentos en el plásmido de expresión quimérico del anticuerpo contra el receptor del IGF-I. A continuación se utilizó este plásmido para expresar el anticuerpo murino completo contra el receptor del IGF-I en los sistemas de expresión de mamífero estándares, tales como la estirpe celular CHO.

TABLA 10: Cebadores diseñados para clonar la región constante $\gamma 1$ murina y la región constante κ murina, respectivamente

Cebadores de la región constante murina		
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID n.º:
MulgG1 C3endX	TTTGGAGCTCTTATTTACCAGGAGAG* GGCTCTT	45
MulgG1 C5endH	TTTTAAGCTTGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT	46
MulgKap C3endB	TTTTGGATCCTAACACTCATTCTGTGAAGC	47
MulgKap C5endE	TTTTGAATTCGGGCTGATGCTGCACCAACTG	48

Se diseñaron los cebadores a partir de las secuencias disponibles en la base de datos de Kabat (Johnson, G. y Wu, T. T. (2001) Nucleic Acids Research, 29: 205-206).

Declaración del depósito

El hibridoma que sintetiza el anticuerpo EM164 murino se depositó en la American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA 20108, el 14 de junio de 2002, bajo los Términos del Tratado de Budapest, con n.º de acceso PTA-4457.

PCT

F170822

Original (para enviar): impreso el 12-6-2003 09:54:49

0-1	Formulario: PCT/RO/134 (EASY) Indicaciones relacionadas con el depósito de microorganismo(s) u otro material biológico (regla PCT 13 bis)	
0-1-1	Preparado con:	PCT-EASY versión 2.92 (actualizado el 1-1-2003)
0-2	Solicitud internacional n.º	PCT/US03/16211
0-3	Referencia de tramitación del solicitante o del agente	F170822
1	Las indicaciones hechas abajo se refieren al microorganismo depositado u otro material biológico citado en la descripción en:	
1-1	página	61
1-2	línea	11
1-3	Identificación del depósito	
1-3-1	Nombre de la institución depositaria	American Type Culture Collection
1-3-2	Dirección de la institución depositaria	10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
1-3-3	Fecha del depósito	14 de junio de 2002 (14-6-2002)
1-3-4	Número de acceso	ATCC PTA-4457
1-4	Indicaciones adicionales	NINGUNA
1-5	Estados especificados para los que se hacen las indicaciones	todos los estados especificados
1-6	Indicaciones en hoja aparte Estas indicaciones se enviarán al oficina internacional más tarde	NINGUNA

SOLO PARA LA OFICINA RECEPTORA

0-4	Este formulario se recibió con la solicitud internacional: (sí o no)	Yes
0-4-1	Funcionario autorizado	Theodora Simpkins

SOLO PARA LA OFICINA INTERNACIONAL

0-5	Este formulario se recibió en la oficina internacional el:	
0-5-1	Funcionario autorizado	

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 [0034]
 <110> ImmunoGen, Inc.
 <120> ANTICUERPO CONTRA EL RECEPTOR DEL IGF-I
 <130> A8338
 <140> 10/170, 390
 10 <141> 2002-06-14
 <160> 98
 <170> PatentIn, versión 3.3
 <210> 1
 <211> 5
 15 <212PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena pesada del anticuerpo
 <400> 1

Ser Tyr Trp Met His
1 5

5 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena pesada del anticuerpo
 <400> 2

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

10 **Arg**
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena pesada del anticuerpo
 <400> 3

Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

20 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena ligera del anticuerpo
 <400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

25 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena ligera del anticuerpo
 <400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

35 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena ligera del anticuerpo
 <400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada del anticuerpo
 <400> 7

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

5

<210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera del anticuerpo
 <400> 8

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

Arg

10

<210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera humanizada

<400> 9

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1          5          10          15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
          20          25          30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

Arg

5

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera humanizada

<400> 10

10

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1          5          10          15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
          20          25          30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

Arg

15

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera humanizada
 <400> 11

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

Arg

5

<210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera humanizada
 <400> 12

10

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

65 70 75 80

ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90

ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada humanizada
 <400> 13

5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 14
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

15

<223> Cebador de PCR degenerado en 3' de la cadena ligera - HindKL
 <400> 14
 tatagagctc aagcttgat ggtggaaga tggatacagt tgggtgc 46

20

<210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR degenerado en 3' de la cadena pesada - Bgl2IgG1
 <400> 15

25

ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt ttggc 36
 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN

```

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR en 5' poli C - EcoPolyc
<400> 16
5   tatatctaga attccccccc ccccccccc      30
<210> 17
<211> 32
<212>   ADN
<213> Secuencia artificial
10  <220>
<223> Cebador de PCR degenerado en 5' de la cadena ligera - Sac1MK
<400> 17
    gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca      32
<210> 18
15  <211> 32
<212>   ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR degenerado en 5' de la cadena pesada - EcoR1MH1
20  <220>
<221> característica miscelánea
<222> (18)..(18)
<223> «n» puede ser cualquier ácido nucleico
<400> 18
25  ctccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc      32
<210> 19
<211> 35
<212>   ADN
<213> Secuencia artificial
30  <220>
<223> Cebador de PCR degenerado en 5' de la cadena pesada - EcoR1MH2
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (18)..(18)
35  <223> «n» puede ser cualquier nucleótido
<400> 19
    ctccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg      35
<210> 20
<211> 10
40  <212>   PRT
<213> Mus musculus
<400> 20
    Asp val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
    1           5           10

<210> 21
<211> 10
<212>   PRT
<213> Mus musculus
<400> 21
    Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys
    1           5           10

50  <210> 22
<211> 24
<212>   PRT
<213> Mus musculus
<400> 22

```

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 1 5 10 15

Ser Ala Val Tyr Tyr Phe Ala Arg
 20

<210> 23
 <211> 57
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 23
 cagggtgtaca ctcccaggctc caactggtgc agtctggggc tgaagtggg aagcctg 57
 10 <210> 24
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador de PCR
 <400> 24
 caatcagaag ttccagggga aggccacac 29
 <210> 25
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 25
 25 ccttcccctg gaacttctga ttgtagttag tacg 34
 <210> 26
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 26
 cagggtgtaca ctccgatggt gtgatgaccc aaactcc 37
 <210> 27
 35 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 40 <400> 27
 cagggtgtaca ctccgatggt ttgatgaccc aaactcc 37
 <210> 28
 <211> 39
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 28
 50 gactagatct gcaagagatg gaggctggat ctccaagac 39
 <210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador de PCR
 <400> 29
 ttgcagatct agtcagagca tagtacaatg 35
 <210> 30
 <211> 48

<212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 5 <400> 30
 gaatgtacc tgcagaaacc aggccagtct ccaaggctcc tgatctac 48
 <210> 31
 <211> 28
 10 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 31
 gtggcagtgg agcagggaca gatttcac 28
 15 <210> 32
 <211> 28
 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador de PCR
 <400> 32
 gaaatctgtc cctgctccac tgccactg 28
 <210> 33
 <211> 19
 25 <212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 <400> 33
 Asp Leu Thr Leu Leu Gln Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala
 30 <210> 34
 <211> 18
 <212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 <400> 34
 Asp val Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ala Arg Glu Lys
 1 5 10 15
 Lys Arg
 35 <210> 35
 <211> 19
 <212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 40 <400> 35
 Asp Gln Ser Leu Ile Pro Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Arg Asp Lys
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala
 45 <210> 36
 <211> 18
 <212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 <400> 36

Asp Met Ser Ser Val Arg Pro Gly Gln Lys Gly Ser Ser Ser Asp Lys
 1 5 10 15

Lys Arg

<210> 37
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 37

5

Glu Val Ser Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

Lys Arg

<210> 38
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 38

10

Glu Val Ser Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

Lys Arg

<210> 39
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 39

15

Gln Gln Gln Ala Leu Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Glu Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Ser Ser Ser Glu Ala Ser
 20 25

20

<210> 40
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 40

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Gln Gly Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20 25

25

<210> 41
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 41

30

Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Lys Asp Asp
 1 5 10 15

Lys Gly Thr Ser Asn Asn Glu Gln Ser
 20 25

<210> 42
 <211> 25

<212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 <400> 42

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Lys Gly Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20 25

5 <210> 43
 <211> 24
 <212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 <400> 43

Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
 1 5 10 15

Gly Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20

10 <210> 44
 <211> 24
 <212 PRT
 <213 > Homo Sapiens
 15 <400> 44

Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
 1 5 10 15

Gly Glu Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20

20 <210> 45
 <211> 40
 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 45

tttgagctc ttattacca ggagagtggg agaggctctt 40

25 <210> 46
 <211> 37
 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de PCR
 <400> 46

ttttaagctt gccaaaacga caccctcatc tgtctat 37

35 <210> 47
 <211> 32
 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 47

40 ttttgatcc taacctcat tcctgtttaa gc 32

45 <210> 48
 <211> 31
 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 48

```

tttgaattc gggctgatgc tgcaccaact g          31
<210> 49
<211> 396
<212>  ADN
5 <213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(396)
<400> 49
  atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct          48
  Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
  1          5          10          15

  tcc agt agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gct          96
  Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
  20          25          30

10  agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att          144
  Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
  35          40          45

  gta cat agt aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca          192
  Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
  50          55          60

  ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct          240
  Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
  65          70          75

  ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca          288
  Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
  85          90          95

  ctc agg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc          336
  Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
  100         105         110

  ttt caa ggt tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg          384
  Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
  115         120         125

  gaa atc aaa cgg          396
  Glu Ile Lys Arg
  130

15 <210> 50
    <211> 132
    <212>  PRT
    <213> Mus musculus
    <400> 50

```


Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 51
 <211> 429
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(429)
 <400> 51

5

10

atg gga tgg agc tat atc atc ctc ttt ttg gta gca aca gct aca gaa 48
 Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Glu
 1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt 192
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

gag tgg att gga gag att aat cct agc aac ggt cgt act aac tac aat 240
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

gag aag ttc aag agg aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
 Glu Lys Phe Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

aca gcc tac atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

tat tac ttt gca aga gga aga cca gat tac tac ggt agt agc aag tgg 384
 Tyr Tyr Phe Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp
 115 120 125

tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 429
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 52
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 52

5

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Glu
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Phe Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp
 115 120 125

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 53
 5
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
 1 5 10

 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 54
 10
 Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn
 1 5 10

 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 55
 15

 Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10 15

 <210> 56
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 56
 20
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

 Ser His Val Pro
 100
 25

 <210> 57
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 57
 30

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

Ala Arg

<210> 58
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 58

5

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

Arg

<210> 59
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 59

10

15

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

Arg

- <210> 60
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Estructura de anticuerpo sintético
- <400> 60

5

10

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

Arg

5

<210> 61
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 61

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

10

<210> 62
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 62

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

Arg

<210> 63
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura del anticuerpo sintético
 <400> 63

5

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

Arg

<210> 64
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 64

10

15

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Thr Ile Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 65

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Estructura de anticuerpo sintético

<400> 65

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Ile Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 66

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Estructura de anticuerpo sintético

<400> 66

5

10

15

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 67

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Estructura de anticuerpo sintético

<400> 67

5

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

Ser His Ala Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10

5

<210> 68
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 68

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

10

<210> 69
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético

15

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (28)..(28)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>

20

<221> característica miscelánea
 <222> (101)..(101)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <400> 69

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Xaa Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Xaa Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 70

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Estructura de anticuerpo sintético

<400> 70

5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

5
 <210> 71
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 71

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

10
 <210> 72
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 72

15
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Estructura de anticuerpo sintético

<400> 73

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Gly Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Pro Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Estructura de anticuerpo sintético

<400> 74

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

<210> 75
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 75

5

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

10

5
 <210> 76
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 76

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

10
 <210> 77
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 77

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

5
 <210> 78
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 78
 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
 115 120

10
 <210> 79
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 79
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5
 <210> 80
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <400> 80
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Trp
 20 25 30
 Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr His Glu Arg Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Cys Leu
 85 90 95
 His Gly Asn Tyr Asp Phe Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

10
 <210> 81
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15
 <223> Estructura de anticuerpo sintético
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (20)..(20)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 20
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (34)..(34)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 25
 <221> característica miscelánea
 <222> (43)..(43)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 30
 <222> (50)..(50)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (52)..(52)
 35
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (54)..(54)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 40
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (57)..(57)

<223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (59)..(59)
 5 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (99)..(99)
 10 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(100)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 15 <221> característica miscelánea
 <222> (103)..(108)
 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (116)..(116)
 20 <223> «x» puede ser cualquier aminoácido
 <400> 81

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

<210> 82
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 82

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 83
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo EM164 humanizado
- <400> 83

5

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 84
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo EM164 humanizado
- <400> 84

10

15

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 85
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo EM164 humanizado
- <400> 85

5

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 86
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo EM164 humanizado

10

15

<400> 86

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 87

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 87

5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

10

<210> 88

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo EM164 humanizado
 <400> 88

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

5

<210> 89
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable del anticuerpo EM164 humanizado - cadena ligera
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)
 <400> 89

10

15

```

gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga      48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1                               5                               10                               15

gat cca gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ata gta cat agt      96
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20                               25                               30

aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct      144
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35                               40                               45

cca agg ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca      192
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50                               55                               60

gac agg ttc agt ggc agt gga gca ggg aca gat ttc aca ctc agg atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65                               70                               75                               80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc ttt caa ggt      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85                               90                               95

tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa      336
Ser His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100                               105                               110

cgt
Arg
339

```

<210> 90
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 90

5

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1                               5                               10                               15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20                               25                               30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35                               40                               45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50                               55                               60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65                               70                               75                               80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85                               90                               95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100                               105                               110

```

Arg

<210> 91
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10

15

<223> Región variable del anticuerpo EM164 humanizado - cadena pesada
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <400> 91

5

cag gtc caa ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg gtg aag cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att	144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gag att aat cct agc aac ggt cgt act aac tac aat cag aag ttc	192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggg aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac ttt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe	
85 90 95	
gca aga gga aga cca gat tac tac ggt agt agc aag tgg tac ttc gat	336
Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp	
100 105 110	
gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc	369
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser	
115 120	

10

<210> 92
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 92

15

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

<210> 93
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo EM164 humanizado v 1.1
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)
 <400> 93

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga	48
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gat cca gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ata gta cat agt	96
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser	
20 25 30	
aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct	144
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca	192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac agg ttc agt ggc agt gga gca ggg aca gat ttc aca ctc agg atc	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile	
65 70 75 80	
agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc ttt caa ggt	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	
85 90 95	
tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa	336
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	
cgt	339
Arg	

<210> 94
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 94

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 95

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo EM164 humanizado v 1.2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 95

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat cca gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ata gta cat agt 96
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca agg ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga gca ggg aca gat ttc aca ctc agg atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa 336
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgt 339
Arg

<210> 96

<211> 113

5

<212 PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 96

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

10

<210> 97
 <211> 339
 <212 ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo EM164 humanizado v 1.3
 <220>

15

<221> CDS
 <222> (1)..(339)
 <400> 97

```

gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga      48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1      5      10      15

gat cca gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ata gta cat agt      96
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20     25     30

aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct      144
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50     55     60

gac agg ttc agt ggc agt gga gca ggg aca gat ttc aca ctc agg atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65     70     75     80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc ttt caa ggt      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85     90     95

tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa      336
Ser His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105    110

cgt
Arg                                          339

```

5

```

<210> 98
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 98

```

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1      5      10      15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20     25     30

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50     55     60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65     70     75     80

ser Arg val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85     90     95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105    110

Arg

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se fija específicamente a un receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-IR), que comprende al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región variable de cadena ligera, en el que dicha región variable de cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 1 a 3, y en el que dicha región variable de cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 4 a 6, y en donde dicho anticuerpo aislado o fragmento del mismo es un antagonista de dicho receptor y está desprovisto de actividad agonista hacia dicho receptor.
- 10 2. Anticuerpo aislado o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que la al menos una región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 7.
- 15 3. Anticuerpo aislado o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que la al menos una región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 8.
- 20 4. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en
- 25 SEQ ID n.º: 9,
SEQ ID n.º: 10,
SEQ ID n.º: 11 y
SEQ ID n.º: 12.
- 30 5. Composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 6. Conjugado que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 unido a un agente citotóxico.
- 40 7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que dicho agente citotóxico se selecciona entre el grupo que consiste en un maitansinoide, un fármaco que contiene moléculas pequeñas, un profármaco, un taxoide, CC-1065 y un análogo de CC-1065.
- 45 8. Composición farmacéutica, que comprende el conjugado según la reivindicación 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 9. Reactivo de diagnóstico, que comprende la composición según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo está marcado con un resto detectable.
- 55 10. Reactivo de diagnóstico según la reivindicación 9, en el que dicho resto detectable se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente para obtener imágenes y un ion metálico.
- 60 11. Método in vitro para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa estimulado por el IGF-I, que comprende poner en contacto dicha célula con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1.
12. Utilización del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1, para fabricar un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer en el que los niveles del receptor del IGF-I están elevados.
13. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1, para el tratamiento de un cáncer en que los niveles del receptor del IGF-I están elevados.
14. Utilización, anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 12 o 13, que comprende adicionalmente la administración de un agente terapéutico a dicho paciente.
15. Utilización, anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 13, en donde dicho agente terapéutico es un agente citotóxico.
16. Utilización del conjugado según la reivindicación 6, para fabricar un medicamento para el tratamiento de un cáncer en el que los niveles del receptor del IGF-I están elevados.
17. Conjugado según la reivindicación 6, para el tratamiento de un cáncer en el que los niveles del receptor del IGF-I están elevados.

- 5 18. Utilización, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado según las reivindicaciones 12 a 17, en donde dicho cáncer es un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial y cáncer de páncreas.
- 10 19. Anticuerpo murino producido por una estirpe celular de hibridoma con número de depósito de la ATCC PTA-4457 o fragmento de fijación a epítipo del mismo que se fija específicamente a un receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I, en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación a epítipo es un antagonista de dicho receptor y está desprovisto de actividad agonista hacia dicho receptor.
- 15 20. Anticuerpo humanizado o anticuerpo con la superficie remodelada derivado de la estirpe celular de hibridoma con número de depósito de la ATCC PTA-4457 o un fragmento de fijación a epítipo del mismo que se fija específicamente a un receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I, en donde dicho anticuerpo o fragmento es un antagonista de dicho receptor y está desprovisto de actividad agonista hacia dicho receptor.
- 20 21. Estirpe celular de hibridoma depositada con número de acceso de la American Type Culture Collection PTA-4457.
22. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo tiene al menos una propiedad seleccionada entre el grupo que consiste en:
- a) inhibe la actividad celular de un IGF-IR sin activar dicho IGF-IR; e
 - b) inhibe el crecimiento celular tumoral en presencia de suero hasta al menos el 80%.

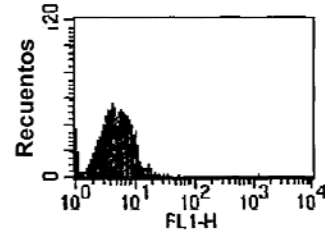
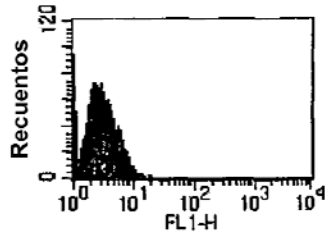
FIGURA 1

Células del receptor del IGF-I
Y1251F

Células del receptor de
la insulina

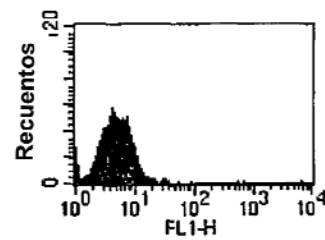
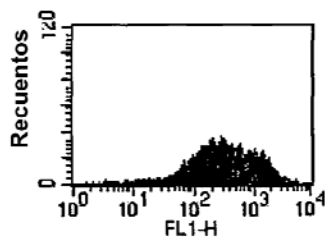
Solo α lgG de ratón de cabra -
FITC

Solo α lgG de ratón de cabra -
FITC



α EM164 a 100 nM

α EM164 a 100 nM



α 1H7 a 100 nM

α IR a 100 nM

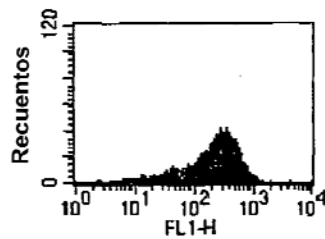
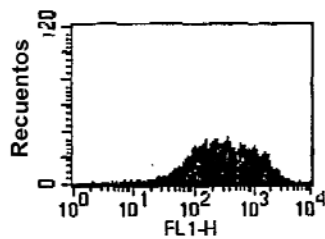


FIGURA 2

**Curva de titulación para la fijación
del anticuerpo EM164 al receptor
del IGF-I biotinilado**

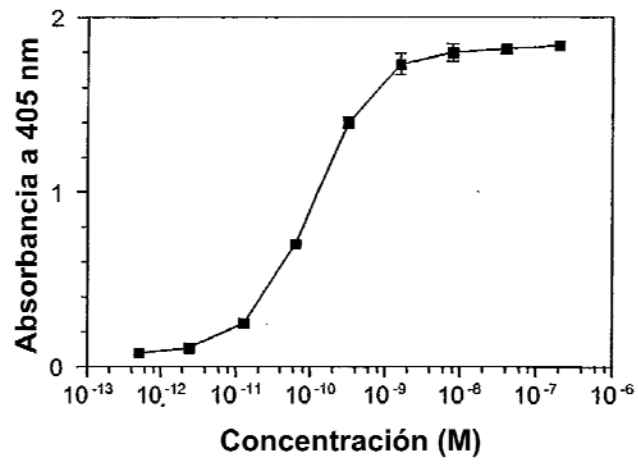


FIGURA 3

**Inhibición de la fijación de biotina-IGF-I
a las células MCF-7 debida al
anticuerpo EM164**

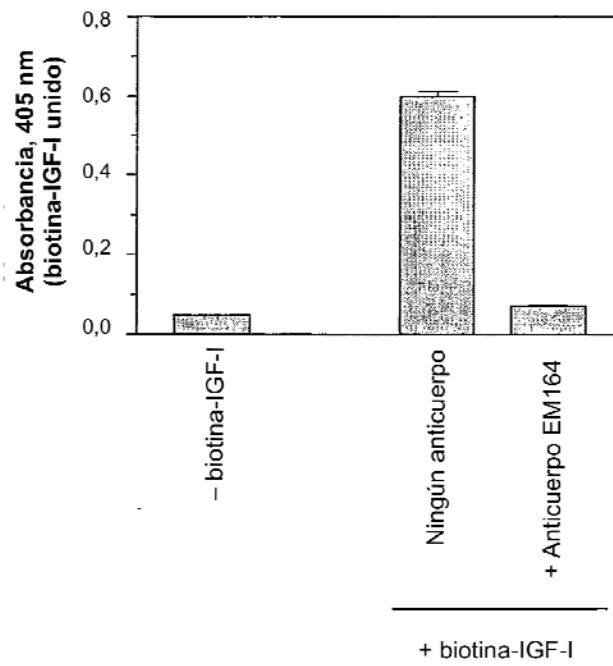


FIGURA 4

**Inhibición de la autofosforilación, estimulada por el IGF-I,
del receptor del IGF-I en la células MCF-7 debida al
anticuerpo EM164**

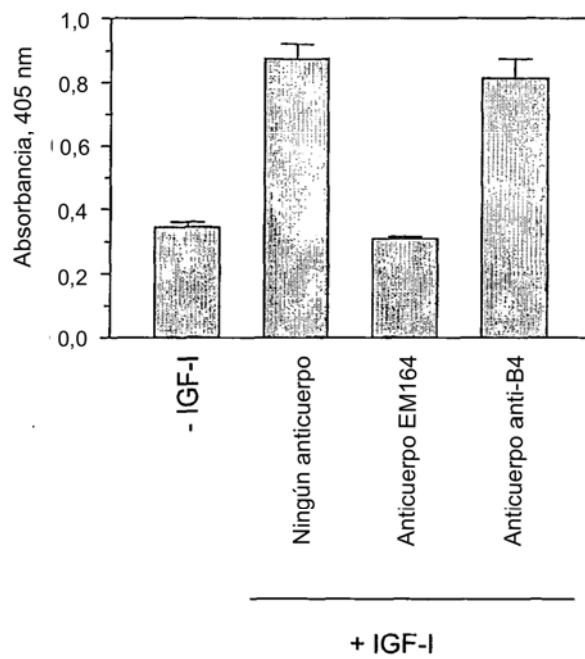


FIGURA 5

Inhibición de la fosforilación del IRS-1, estimulada por el IGF-I, en las células MCF-7 debida al anticuerpo EM164

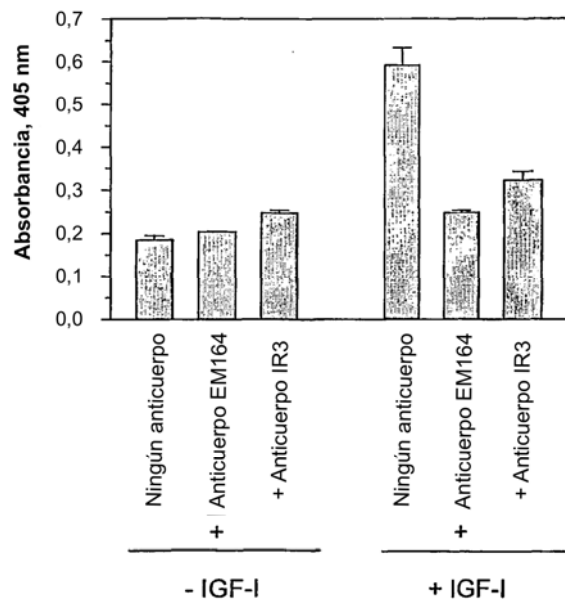


FIGURA 6

inhibición de la transducción de señales, estimulada por el IGF-I, en las células SaOS-2 debida al anticuerpo EM164

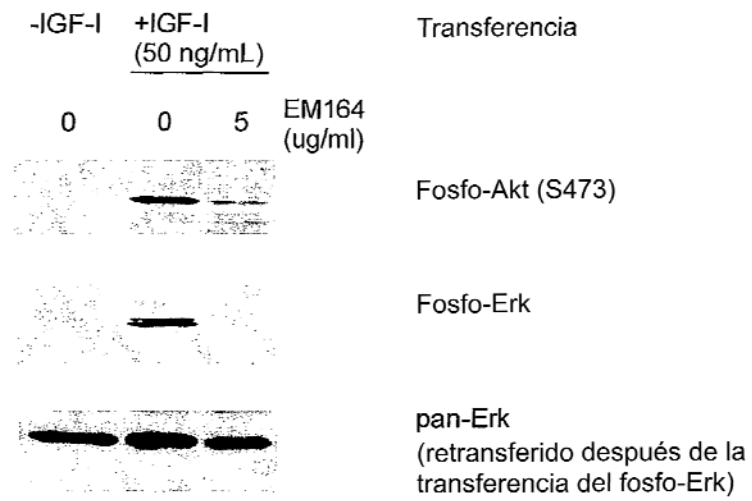


FIGURA 7

Efecto de los anticuerpos sobre el crecimiento y la supervivencia de las células MCF-7 en condiciones sin suero, + IGF-I o + suero al 1,25%

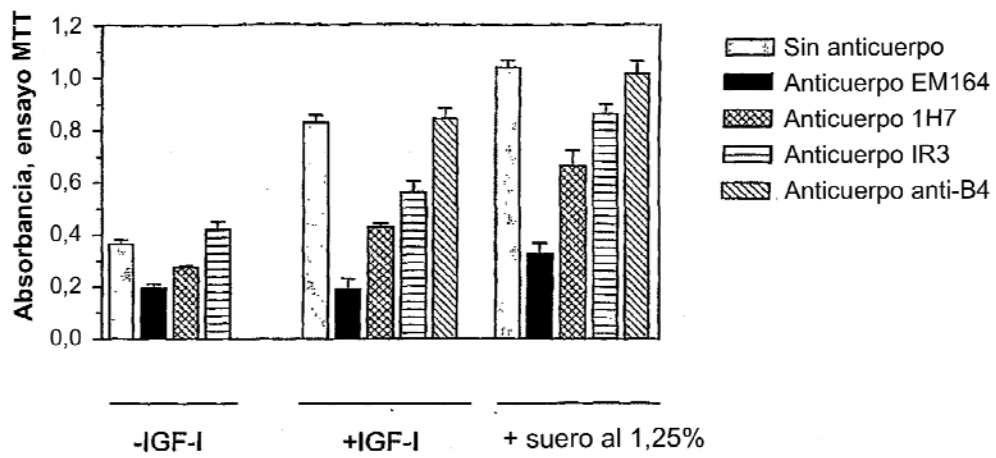


FIGURA 8

Efecto del anticuerpo EM164 sobre el crecimiento y la supervivencia de células MCF-7 en suero al 0,04-10%

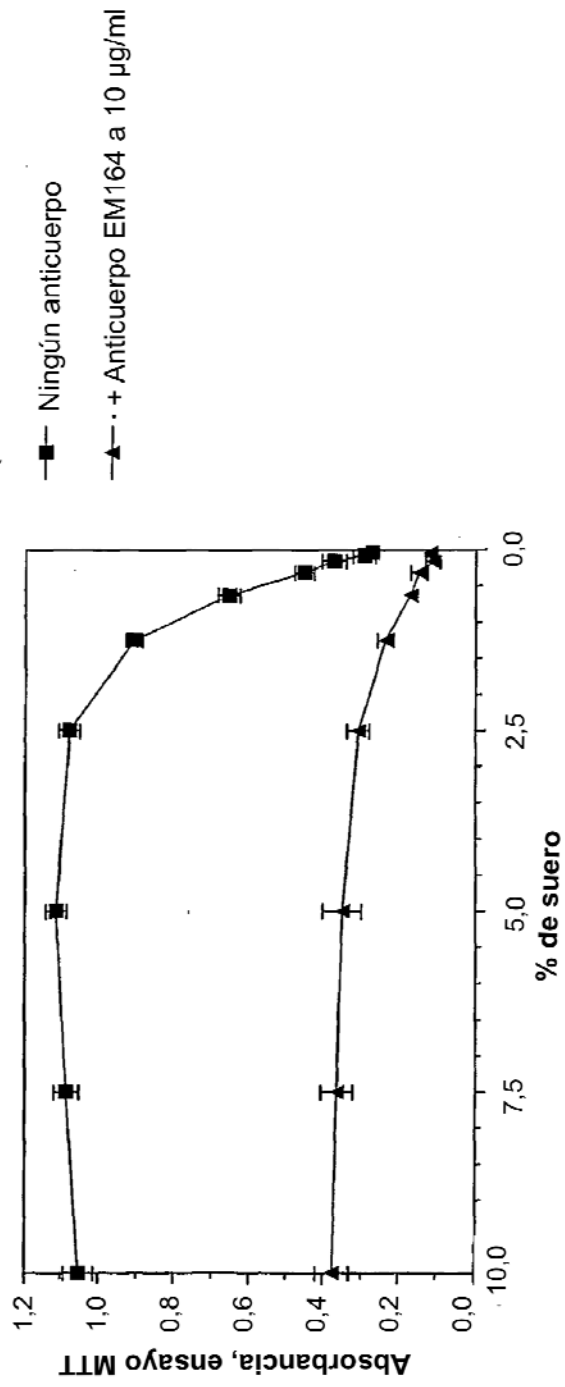


FIGURA 9

Inhibición del crecimiento y la supervivencia, estimulados por el suero y el IGF-I, de las células NCI-H838

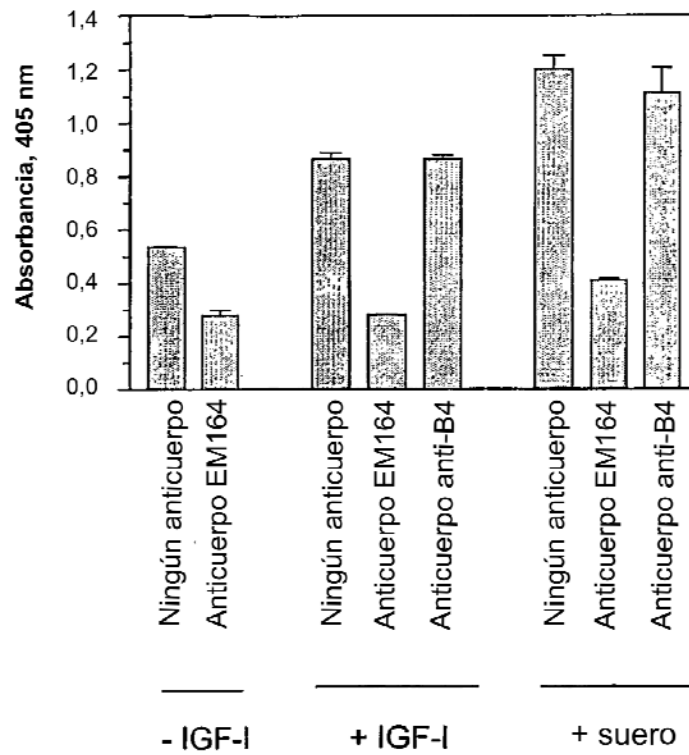


FIGURA 10

Efecto del tratamiento con el anticuerpo EM164, o taxol, o una politerapia de anticuerpo EM164 y taxol, sobre el crecimiento del xenoinjerto de cáncer de pulmón Calu-6 en los ratones

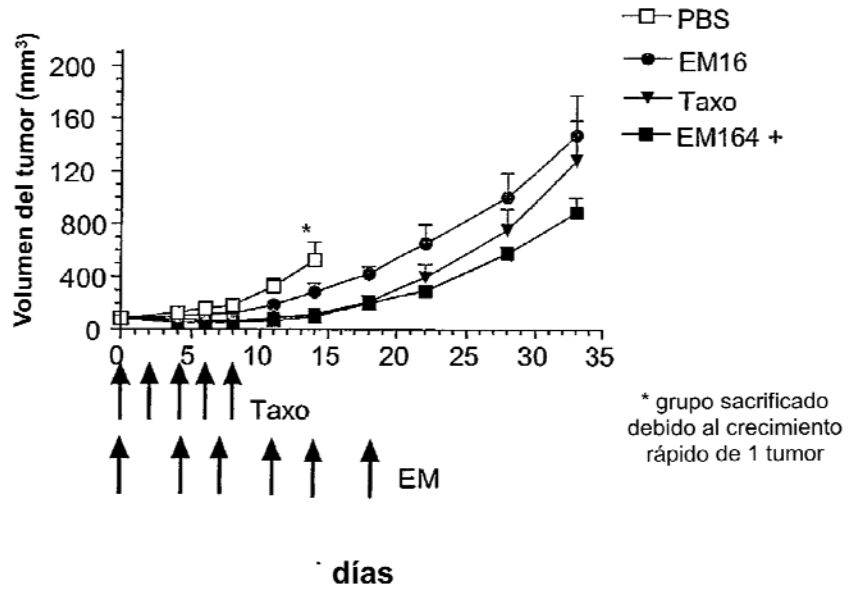


FIGURA 11

Fijación competitiva del anticuerpo EM164 humanizado (versión 1.0) al receptor del IGF-I biotinilado inmovilizado por el anticuerpo EM164 murino (intervalo de concentración molar de 1,06 a 10,6 veces)

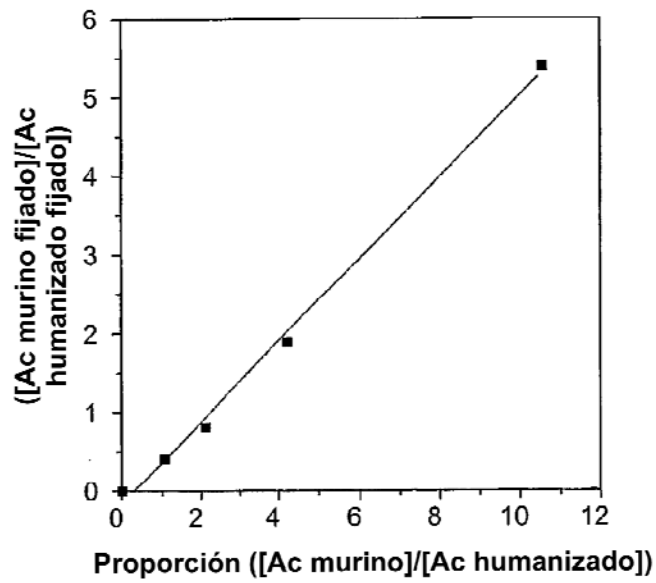


FIGURA 12



Cadena ligera del EM164 murino

```

1 atgaagttgcctggttaggctgttggtgctgatgttctggattcct
1 M K L P V R L L V L M F W I P

46 gcttccagtagtgatgttttgatgacccaaactccactctccctg
16 A S S S D V L M T Q T P L S L
    LVK

91 cctgtcagtccttgagatcaagcctccatctcttgcagatctagt
31 P V S L G D Q A S I S C R S S
                               CDR1

136 cagagcattgtacatagtaatgtaaacacctatttagaatggtac
46 Q S I V H S N V N T Y L E W Y
    CDR1

181 ctgcagaaaccaggccagtcctccaaagctcctgatctacaaagtt
61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V
                               CDR2

226 tccaaccgattttctgggggtcccagacagggttcagtgccagtgga
76 S N R F S G V P D R F S G S G
    CDR2

271 tcagggacagatttcacactcaggatcagcagagtggaggctgag
91 S G T D F T L R I S R V E A E

316 gatctgggaatttattactgctttcaaggttcacatggttcctccg
106 D L G I Y Y C F Q G S H V P P
                               CDR3

361 acgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgg
121 T F G G G T K L E I K R
    
```

FIGURA 13



Cadena pesada del EM164 murino

1 atgggatggagctatatcatcctctttttggtagcaacagctaca
 1 M G W S Y I I L F L V A T A T

46 gaagtccactcccaggtccaactgcagcagctctggggctgaactg
 16 E V H S Q V Q L Q Q S G A E L
 LH

91 gtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcctgtaaggcttctggc
 31 V K P G A S V K L S C K A S G

136 tacaccttcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcct
 46 Y T F T S Y W M H W V K Q R P
 CDR1

181 ggacaaggccttgagtggattggagagattaatcctagcaacggt
 61 G Q G L E W I G E I N P S N G
 CDR2

226 cgtactaactacaatgagaagttcaagaggaaggccacactgact
 76 R T N Y N E K F K R K A T L T
 CDR2

271 gtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctg
 91 V D K S S S T A Y M Q L S S L

316 acatctgaggactctgcggtctattactttgcaagaggaagacca
 106 T S E D S A V Y Y F A R G R P
 CDR3

361 gattactacggtagtagcaagtggacttcgatgtctggggcgca
 121 D Y Y G S S K W Y F D V W G A
 CDR3

406 gggaccacggtcaccgtctcctca
 136 G T T V T V S S

FIGURA 14

Las CDR del EM164 murino

Cadena ligera

CDR1: R S S Q S I V H S N V N T Y L E

CDR2: K V S N R F S

CDR3: F Q G S H V P P T

Cadena pesada

CDR1: S Y W M H

CDR2: E I N P S N G R T N Y N E K F K R

CDR3: G R P D Y Y G S S K W Y F D V

Cadena pesada del AbM

CDR1: G Y T F T S Y W M H

CDR2: E I N P S N G R T N

CDR3: G R P D Y Y G S S K W Y F D V

FIGURA 15

Comparaciones de las secuencias de las células reproductoras

Cadena ligera		50
Cr1	- DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK	
muEM164	- -----V-----	
		100
Cr1	- LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVP	
muEM164	- -----R-----I-----	
Cadena pesada		50
J558.c	- QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGE	
muEM164	- -----S-----	
		98
J558.c	- INPSNGRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCAR	
muEM164	- -----R-----L-----F--	

FIGURA 16

Mapas de los plásmidos de clonación y de expresión en mamíferos

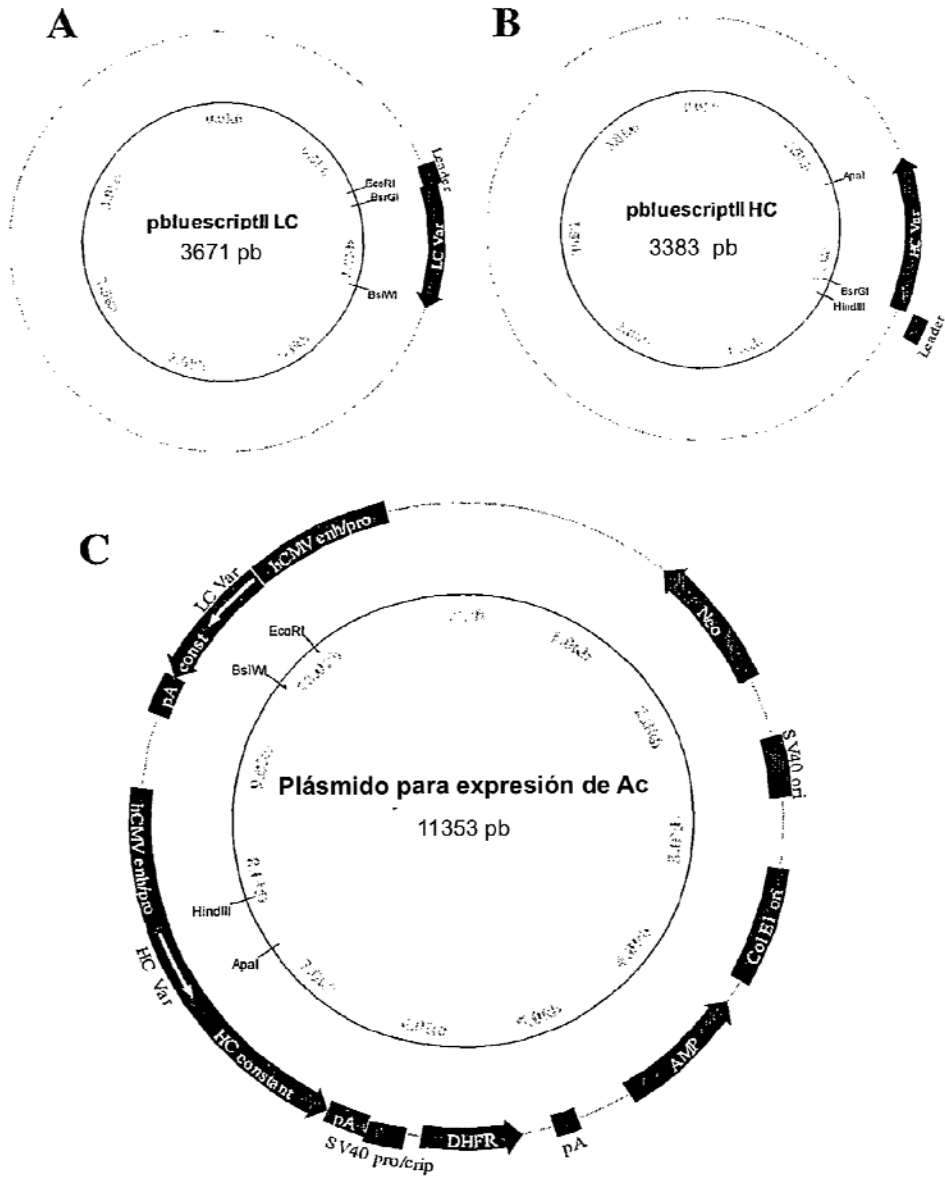


FIGURA 17

Alineamiento de la secuencia de las 10 cadenas ligeras más homólogas

