

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 727**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 09075103 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2100614**

54 Título: **Anticuerpo contra PDGFR-alfa para uso en el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

17.06.2005 US 691920 P

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

23.12.2013

73 Titular/es:

**IMCLONE LLC (100.0%)
450 East 29th Street, 12th Floor
New York, NY 10016, US**

72 Inventor/es:

**LOIZOS, NICK y
HUBER, JIM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 727 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 PDGFR-alfa para uso en el tratamiento de tumores

Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. número 60/691.920.

Campo de la invención

- 5 La invención proporciona procedimientos para tratar el cáncer de huesos, en particular el cáncer de huesos metastásico, administrando un antagonista del PDGFR α . La invención también proporciona anticuerpos que se unen al PDGFR α humano y neutralizan la activación del receptor. La invención proporciona además un procedimiento para neutralizar la activación del PDGFR α , y a un procedimiento de tratar a un mamífero con una enfermedad neoplásica usando los anticuerpos solos o en combinación con otros agentes.

10 Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata es el cáncer más frecuente entre los varones, con aproximadamente 220.000 casos y 29.000 muertes anuales en EE.UU. Una proporción significativa de varones con diagnóstico de cáncer de próstata tienen enfermedad metastásica. Además, las metástasis en última instancia se desarrollan en muchos pacientes de cáncer de próstata a pesar del tratamiento con cirugía o radioterapia. El hueso es el sitio más frecuente de la metástasis del
 15 cáncer de próstata y también es un lugar en el que los cánceres de mama y los cánceres de pulmón suelen metastatizar. La mayoría de las metástasis del cáncer de próstata son dependientes de andrógenos, de modo que existe una respuesta rápida a la castración quirúrgica o médica, pero en casi todos los pacientes, el tumor se convierte en última instancia en independiente de andrógenos, lo que conduce a una significativa morbilidad y mortalidad. Una vez que se producen metástasis óseas, los tratamientos disponibles actualmente tienen efectos limitados. El tratamiento más eficaz aprobado descrito para el cáncer de próstata metastásico (administración de docetaxel) prolonga la mediana de la supervivencia aproximadamente tres meses. (Petrylak y col., 2004, N. Engl. J. Med. 351:1513; Tannock y col., 2004, N. Engl. J. Med. 351:1502). De acuerdo con lo anterior, se necesitan urgentemente nuevos tratamientos para el cáncer de huesos metastásico.

El receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-IR) es un receptor tirosina cinasa transmembrana ubicuo que es esencial para que el crecimiento y el desarrollo fetal y posnatal sean normales. El IGF-IR se localiza en la superficie celular de la mayoría de los tipos de células y sirve como molécula de señalización para los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II (en conjunto denominados en el presente documento IGF). El IGF-IR puede estimular la proliferación celular, la diferenciación celular, cambios en el tamaño de la célula, y proteger a las células de la apoptosis. También se ha considerado casi obligatorio para la transformación celular (recapitulación en Adams y col., Cell. Mol. Life Sci. 57:1050-93 (2000); Baserga, Oncogene 19:5574-81 (2000)). Se han notificado niveles altos de expresión de IGF-IR en muestras de tejido de metástasis óseas de cáncer de próstata. El hueso contiene el almacén más grande de IGF en el organismo.

El IGF-IR es un heterotetrámero preformado que contiene dos cadenas alfa y dos beta unidas covalentemente por puentes disulfuro. Las subunidades del receptor se sintetizan como parte de una cadena polipeptídica sencilla de 180 kd, que después se procesa proteolíticamente en las subunidades alfa (130 kd) y beta (95 kd). Toda la cadena alfa es extracelular y contiene el lugar de unión al ligando. La cadena beta procesa el dominio transmembrana, el dominio tirosina cinasa y una extensión en C-terminal que es necesaria para la diferenciación y la transformación celulares, pero es innecesaria para la señalización de mitógenos y la protección frente a la apoptosis.

El IGF-IR es muy similar al receptor de la insulina (IR), en particular dentro de la secuencia de la cadena beta (homología del 70 %). Debido a esta homología, en estudios recientes se ha demostrado que estos receptores pueden formar híbridos que contienen un dímero IR y un dímero IGF-IR (Pandini y col., Clin. Conc. Res. 5:1935-19 (1999)). La formación de híbridos se produce en células tanto normales como transformadas y el contenido en híbrido depende de la concentración de los dos receptores homodiméricos (IR e IGF-IR) dentro de la célula. Aunque los receptores híbridos están compuestos por pares de IR e IGF-IR, los híbridos se unen de forma selectiva a los IGF, con una afinidad similar a la de IGF-IR, y solo se unen débilmente a la insulina ((Siddle y Soos, The IGF System. Humana Press. pp. 199-225. 1999). Por tanto, estos híbridos se pueden unir a los IGF y translucen las señales en células normales y transformadas.

Un segundo receptor de IGF, el IGF-IIR, o receptor de manosa-6-fosfato (M6P), también se une al ligando IGF-II con una afinidad elevada, pero carece de actividad tirosina cinasa (Oates y col., Breast Cancer Res. Treat. 47:269-81 (1998)). Debido a que da lugar a la degradación de IGF-II, se considera un sumidero para IGF-II, siendo un antagonista de los efectos estimulantes del crecimiento de este ligando. La pérdida de IGF-IIR en las células tumorales puede aumentar el potencial crecimiento mediante la liberación de su efecto antagonista sobre la unión de IGF-II con el IGF-R (Byrd y col., J. Biol. Chem. 274:24408-16 (1999)).

Los receptores alfa y beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR α y PDGFR β) son las tirosina cinasas receptoras de tipo III- El PDGFR α es crucial para el desarrollo y satisface importantes funciones en la edad adulta. Por ejemplo, los ratones homocigotos para una mutación completa mueren durante la embriogénesis. En estadios posteriores del desarrollo, el PDGFR α se expresa en muchas estructuras mesenquimatosas, mientras que

las células epiteliales adyacentes producen factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF). Las muestras de tejido de glándulas prostáticas normales o hiperplásicas dan negativo en los análisis de PDGFR α , mientras que los tumores de próstata primarios y las masas esqueléticas de sujetos equivalentes expresan PDGFR α . Además, de las líneas de células de próstata obtenidas de diferentes lugares de metástasis, el PDGFR α se encuentra en las células PC3 derivadas de metástasis ósea, pero no en líneas celulares obtenidas de metástasis en ganglios linfáticos (LNCaP) y cerebro (DU-145).

La familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas de factores de crecimiento está constituida por cinco dímeros diferentes unidos por puentes disulfuro, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD, que actúan mediante PDGFR α y PDGFR β . Estos factores de crecimiento son moléculas dimericas compuestas por cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro que se unen a dos proteínas receptoras de forma simultánea e inducen la dimerización, autofosforilación y señalización intracelular del receptor. PDGFR α y PDGFR β son estructuralmente similares y pueden formar heterodímeros así como homodímeros. Dado que el PDGFR β no se une a la cadena con alta afinidad, el PDGF-AA solo activa dímeros de receptores $\alpha\alpha$, mientras que PDGF-AB y PDGF-CC activan los heterodímeros receptores $\alpha\beta$.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de tumores óseos primarios y metastásicos, incluidos tumores que proceden de la próstata, la mama o los pulmones, y expresan el receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina (IGF-IR) y/o el receptor del factor de crecimiento alfa derivado de las plaquetas (PDGFR α).

Los tumores que se van a tratar pueden ser dependientes de hormonas/andrógenos o independientes de hormonas/andrógenos y pueden originarse en, por ejemplo, la próstata, las mamas o los pulmones.

La invención proporciona procedimientos de tratar a un sujeto que tenga un tumor óseo y procedimientos de inhibir el crecimiento de un tumor óseo. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de PDGFR α . Los antagonistas del receptor incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, así como inhibidores de moléculas pequeñas intracelulares.

La invención también proporciona anticuerpos anti-PDGFR α que se unen a su receptor diana e inhiben la unión del ligando. La invención también proporciona anticuerpos y otros antagonistas que neutralizan la activación de PDGFR α . Además, determinados anticuerpos estimulan la regulación por disminución de su receptor diana, por ejemplo mediante internalización y/o degradación. De acuerdo con esto, los anticuerpos y los antagonistas de molécula pequeña funcionan inhibiendo la activación de las moléculas de señalización cadena abajo tales como Akt, p42/p44 y MAPK.

Los procedimientos incluyen el uso de antagonistas de IGF-IR o PDGFR α solos, en combinación uno con otro o en combinación con otras terapéuticas del cáncer, tales como quimioterapia y radiación.

La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a PDGFR α , así como nucleótidos y células huésped para la producción de los anticuerpos. Los anticuerpos bloquean la unión del ligando y neutralizan la activación del receptor. La invención también proporciona el uso de los anticuerpos solos, en combinación con otros antagonistas del receptor o agentes antineoplásicos, o como conjugados para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Los anticuerpos anti-PDGFR α se usan para tratar, por ejemplo, tumores de ovarios, tumores de mama, tumores de pulmón, tumores hepatocelulares, tumores estromales gastrointestinales, melanomas, carcinomas de células renales, tumores de la próstata y sarcomas de tejidos blandos.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado para PDGFR α humano, que comprende SSSYY (SEC ID N°: 2) en CDRH1; SFFYTGSTYYNPSLR (SEC ID N° :4) en CDRH2; QSTYYYGSGNYYGWFDR (SEC ID N°: 6) en CDRH3; RASQSVSSYLA (SEC ID N°: 10) en CDRL1; DASNRAT (SEC ID N°: 12) en CDRL2; y QQRSNWPPA (SEC ID N°: 14) en CDRL3

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLQRSPGKGLEWIGSFFY TGSTYYNPSLR (SEC ID N°: 8) o una región variable de la cadena ligera que tiene EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGQTKVEIK (SEC ID N°: 16).

Más preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLQRSPGKGLEWIGSFFY TGSTYYNPSLR (SEC ID N°: 8) y una región variable de la cadena ligera que tiene EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGQTKVEIK (SEC ID N°: 16).

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende, preferentemente, una cadena pesada que tiene

MGWSCIIILFLVATATGVHSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWYG

WLRQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADT

5 AVYYCARQSTYYYGSGNYYGWFDWRDQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS

GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS

SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP

KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

10 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 31)

y una cadena ligera que tiene

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ

QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSN

WPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW

KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS

SPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 33).

15 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención inhibe la unión de PDGFR α a un ligando de PDGFR α o neutraliza PDGFR α .

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un ácido polinucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

20 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un vector de expresión que comprende el ácido polinucleico descrito unido operativamente a elementos de control de la expresión de modo que se pueda expresar el anticuerpo o fragmento codificado.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona una célula recombinante que comprende el vector descrito en lo que antecede, célula recombinante que es capaz de producir un anticuerpo o fragmento también descrito anteriormente

25 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede producir cultivando la célula recombinante descrita anteriormente de modo que se produzca el anticuerpo o fragmento y el anticuerpo o fragmento se recupera del cultivo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la invención para usar como medicamento.

30 Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe el crecimiento de un tumor primario, un tumor metastásico, un tumor resistente o un tumor vascularizado en un mamífero.

Preferentemente, el tumor se selecciona de un tumor ovárico, un tumor de mama, un tumor pulmonar, un tumor hepatocelular, un tumor estromal gastrointestinal, un melanoma, un carcinoma de células renales, un tumor de próstata, un tumor óseo, un sarcoma de tejidos blandos, un leiomioma y un glioblastoma.

Descripción de las figuras

35 La Figura 1 representa el crecimiento de tumores de xenoinjertos subcutáneos LuCaP 35V en ratones SCID castrados durante un periodo de tratamiento iniciado cuando los tumores hubieron alcanzado 150-200 mm³. Panel A: controles sin tratar; Panel B: se trató a los animales durante cuatro semanas con 10 mg/kg o 20 mg/kg) solos, o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12); Panel C: niveles séricos de PSA en ratones SCID portadores de tumores de xenoinjerto LuCaP 35V subcutáneos sin tratar y tratados. Los ratones tratados recibieron docetaxel (20 mg/kg) solo o docetaxel (10 mg/kg o 20 mg/kg) en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12). El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado 150-200 mm³ y terminó tras cuatro

semanas.

La Figura 2 muestra suspensiones de células únicas de tumores de xenoinjerto LuCaP 35V tratados con docetaxel (10 mg/kg) solo (Panel A) o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12) (Panel B). El campo marcado con R1 corresponde a células apoptóticas con ADN fragmentado (aumento de marcaje con FITC).

- 5 La Figura 3 muestra la síntesis de ADN (captación de BrDu) en xenoinjertos tumorales tras la finalización del tratamiento con docetaxel (10 mg/kg o 20 mg/kg) solo o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12).

10 La Figura 4 representa la expresión diferencial de genes asociados con la agresividad del tumor de próstata (TUBB), la resistencia al tratamiento antiandrogénico (BIRC 5) y la inducción de apoptosis (IGFBP3) en células de tumor de próstata en respuesta al tratamiento con docetaxel y A12 y docetaxel solo.

La Figura 5 muestra los niveles séricos de A12 tras la finalización del tratamiento.

La Figura 6 muestra el peso corporal (una medida de la citotoxicidad global) de animales sanos tratados de forma continua con docetaxel (10 mg/kg o 20 mg/kg) solo o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12).

- 15 La Figura 7 muestra el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-IGF-IR (IMC-A12) en PSA producido por el xenoinjerto en ratones SCID en los que se han injertado células LuCaP 23.1.

La Figura 8 muestra una serie de fotografías de rayos X de ratones SCID en los que se han injertado células LuCaP 23.1. Los ratones A12 recibieron 40 mg/ml de IMC-A12 i.p. tres veces a la semana durante seis semanas. En el momento del sacrificio se realizaron fotografías de rayos X.

- 20 La Figura 9 muestra los niveles de PSA (a) y radiografías representativas (b) de ratones SCID con xenoinjertos intratibiales de células de próstata humana LuCaP 23.1.

25 La Figura 10 representa el efecto del aspirado de médula ósea humana sobre la actividad Akt en células de cáncer de próstata. Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE. Para el análisis de transferencia de tipo western, se transfirieron a membranas anticuerpos dirigidos a fosfo-Akt (Ser-473, cell signaling Technology), PDGFR α (R&D Systems) y actina (Sigma). La unión del anticuerpo primario se detectó usando proteína A o proteína G conjugada con HRP (Sigma).

30 La Figura 11 representa inducción e inhibición de la fosforilación de AKT en células PC3-ML. El Panel A muestra la inhibición dependiente de la dosis de AG-1296 de la fosforilación de Akt en células expuestas a 30 ng/ml de PDGF-BB. El Panel B muestra fosforilación de Akt en el aspirado óseo e inhibición por A-1296 20 μ M. El Panel C muestra la potencia del aspirado de la médula ósea para inducir fosforilación de Akt en comparación con la potencia de una combinación de 100 pg/ml de PDGF-AA y 100 pg/ml PDGF-BB. El panel D compara las magnitudes de fosforilación de Akt inducida por el aspirado de médula ósea, la inhibición de la fosforilación de Akt mediante A-1296 inducida por la médula ósea y la fosforilación de Akt inducida por PDGF-AA + PDGF-BB.

35 La Figura 12 representa la inhibición de la fosforilación de Akt en células PC3-ML mediante antagonistas de PDGFR α . El panel A muestra el efecto dependiente de la dosis del anticuerpo monoclonal IMC-3G3 sobre la fosforilación de Akt inducida por 30 ng/ml de PDGF-BB. Los paneles B y C proporcionan una comparación de los efectos de IMC-3G3 y AG1296 sobre la fosforilación de Akt inducida por la médula ósea. El panel D muestra que la inhibición de la fosforilación de Akt depende del tiempo de preincubación con IMC-3G3.

40 La figura 13 muestra la unión del anticuerpo al PDGFR α . A: unión directa del anticuerpo anti-PDGFR α al dominio extracelular inmovilizado de PDGFR α . B: Inhibición de la unión de [¹²⁵I]PDGF-AA a PDGFR α inmovilizado.

La Figura 14 muestra inhibición específica de la fosforilación de PDGFR α y las moléculas efectoras cadena abajo.

La Figura 15 muestra la inhibición de la incorporación de timidina [³H] estimulada con PDGF-AA en células PAE R α por los AcMo.

45 La Figura 16 muestra la inhibición de la activación de la molécula efectora cadena abajo inducida por PDGF-AA en células SKLMS-1 (A) y U118 (B).

La Figura 17 muestra la inhibición de la incorporación de timidina [³H] estimulada con PDGF-AA en células U118 (A) y SKLMS-1 (B) por los AcMo. La inhibición de la incorporación de timidina [³H] estimulada con PDGF-BB también se muestra en las células U118 (A) y SKLMS-1 (B).

50 La Figura 18 muestra los efectos dependientes de la dosis para el tratamiento de xenoinjertos tumorales establecidos U118 (glioblastoma; panel A) y SKLMS-1 (leiomiocoma; panel B) en ratones atímicos.

La Figura 19 muestra la reducción de la fosforilación de PDGFR α *in vivo* en tumores U118 tratados con el anticuerpo

anti-PDGFR α en comparación con el tratamiento con IgG inespecífico.

La Figura 20 representa los vectores de expresión de GS usados para clonar el hibridoma derivado de los genes de las regiones variables de VH y Vk humanos y la expresión de las proteínas completas de las cadenas pesada (IgG1) y ligera. Los dos vectores se recombinaron como se explica en los Ejemplos y el vector combinado se transfectó en células NS0.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere al tratamiento de tumores óseos con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina (IGF-IR). La expresión endocrina de IGF-I está regulada principalmente por hormonas de crecimiento y se produce en el hígado, pero otros tipos de tejido también son capaces de expresar IGF-I, incluido el hueso que contiene un gran almacén de factores de crecimiento. Dependiendo del tipo de célula tumoral, el IGF-I está implicado en la regulación endocrina, paracrina y/o autocrina (Yu, H. y Rohan, J., J. Natl. Cancer Inst. 92:1472-89 (2000)).

Se ha descubierto que los anticuerpos que se unen a IGF-IR son útiles en terapias para el tratamiento de tumores óseos que expresan IGF-IR. Los anticuerpos se pueden usar solos o en combinación con otras terapéuticas para el cáncer, en particular quimioterapia. El tratamiento Anti-IGF-IR solo o en combinación con tratamiento con uno o más agentes antineoplásicos (tales como, por ejemplo, quimioterapia o radioterapia) tiene una eficacia terapéutica significativa. La supresión del crecimiento tumoral a menudo se acompaña de un incremento de la apoptosis y persiste tras el cese del tratamiento y los tumores han comenzado de nuevo a crecer en los animales tratados solo con quimioterapia.

También se ha descubierto que el PDGFR α desempeña un papel importante en el crecimiento de tumores óseos. Por ejemplo, determinadas líneas celulares tumorales que expresan PDGFR α metastatizan preferentemente en el hueso. Dichas líneas celulares muestran una mayor activación de PDGFR α y fosforilación de las moléculas de señalización cadena abajo en respuesta a factores solubles presentes en la médula ósea. La activación de PDGFR α por la médula ósea es reducida o inhibida completamente por los antagonistas del PDGFR α y la fosforilación de las moléculas de señalización cadena abajo que normalmente se activan mediante señalización a través de PDGFR α y otros sistemas de tirosina cinasa receptores se reducen considerablemente. Determinados datos sugieren que la vía de supervivencia de PI3K/Akt es activada por la señalización de PDGFR α no solo mediante ligandos que activan el PDGFR α directamente sino también por factores presentes en la médula ósea que producen transactivación del receptor.

Los tumores óseos primarios que se van a tratar de acuerdo con la invención incluyen, entre otros, osteosarcomas, condrosarcomas, fibrosarcomas y hemangiosarcomas. Es notable el hecho de que los tumores secundarios malignos (metastáticos) son mucho más frecuentes que los tumores óseos primarios. Los tumores óseos metastáticos que se van a tratar de acuerdo con la invención pueden proceder de varias fuentes, la más frecuente de los cuales son cánceres de próstata, de mama o de pulmones. La fuente de un cáncer óseo metastático normalmente se pondrá de manifiesto con los antecedentes de los pacientes. Los tumores pueden ser osteoblásticos u osteolíticos. Los tumores pueden depender de la estimulación de IGF-IR cuando se producen o pueden ser un nexo hacia la dependencia de IGF-IR. Por ejemplo, los cánceres de próstata o las metástasis de los cánceres de próstata que inicialmente son dependientes de hormonas/andrógenos y se pueden controlar mediante tratamientos físicos o químicos que suprimen la producción de andrógenos o de hormonas, pueden pasar a ser independientes de hormonas/andrógenos a través del incremento de la sensibilidad a la estimulación mediante IGF-IR. Adicionalmente, además de proporcionar tratamiento de tumores independientes de hormonas/andrógenos, la presente divulgación puede ser útil para tratar tumores óseos dependientes de hormonas/andrógenos sin depender de la supresión de la producción de andrógenos u hormonas, por ejemplo mediante coadministración de anticuerpos frente a IGF-IR con agentes antineoplásicos. Dichos tumores incluirían tumores óseos metastáticos que se estimulan mediante el IGF-IR en el entorno rico en IGF de dicho hueso, que pueden ser sensibles a la estimulación hormonal pero no lo bastante sensibles al crecimiento son implicación de IGF. Para estos tumores puede no ser necesaria la ablación hormonal.

Los tumores óseos que dependen de PDGF se pueden tratar de acuerdo con la invención, así como los tumores que son dependientes de la "médula ósea". Los tumores dependientes de la médula ósea muestran activación de PDGFR α en respuesta a factores solubles presentes en la médula ósea. Por ejemplo, como se ilustra en el presente documento, una línea celular cancerosa que expresa PDGFR α metastásica humana experimenta activación de PDGFR α y fosforilación de Akt⁺ tras la exposición al aspirado de médula ósea. Un anticuerpo anti-PDGFR α y un antagonista de anti-PDGFR α de molécula pequeña inhiben cada uno la activación de anti-PDGFR α y la fosforilación de Akt⁺ en la línea celular. Los factores solubles de la médula ósea que activan el PDGFR α incluyen, entre otros PDGF-AA y -BB.

Aunque dicha dependencia de la médula ósea implica señalización a través del PDGFR α , puede no implicar únicamente la unión de PDGFR α de un ligando de PDGFR α . Por ejemplo, como se ilustra en el presente documento, cabe observar que la activación del PDGFR α por ligandos definidos (PDGF-AA o -BB) es más débil que la activación por aspirado de médula ósea. Además, se observa que en presencia de aspirado de médula ósea, la

- fosforilación de Akt+ disminuye con el incremento del tiempo de incubación. En conjunto, estos resultados sugieren que además de responder la unión de PDGF, el PDGFR α se puede transactivar (fosforilar) mediante otros elementos de transducción de la señal (p. ej., otras tirosina cinasas receptoras) sensibles a otros componentes de la médula ósea. En cualquier caso, en una línea celular adecuada para el crecimiento metastásico en hueso (es decir, una línea celular que metastatiza preferentemente en el hueso), se observa activación de PDGFR α dependiente de
- 5 una línea celular que metastatiza preferentemente en el hueso), se observa activación de PDGFR α dependiente de médula ósea, que inhibe los antagonistas del PDGFR α . Además, el tratamiento con un antagonista del PDGFR α inhibe la estimulación inducida por médula ósea de la vía antiapoptótica de PI3K/Akt y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK).
- Los tumores óseos que se van a tratar con un antagonista del PDGFR α pueden surgir como metástasis de las
- 10 células cancerosas de próstata y, como anteriormente, pueden ser dependientes de andrógenos/hormonas o haber pasado a ser independientes de andrógenos/hormonas. Dichos tumores también pueden producirse como metástasis de cánceres no prostáticos. Un experto en la técnica podría fácilmente diagnosticar estas afecciones y trastornos usando pruebas convencionales conocidas.
- Tratamiento significa cualquier tratamiento de una enfermedad en un animal e incluye: (1) prevenir que se produzca la enfermedad en un mamífero que pueda estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no ha experimentado o mostrado síntomas de la enfermedad, por ejemplo prevención de un brote de los síntomas clínicos; (2) inhibir la enfermedad, por ejemplo detener su desarrollo; o (3) aliviar la enfermedad, por ejemplo produciendo la regresión de los síntomas de la enfermedad. Inhibir el crecimiento tumoral incluye ralentizar o detener el crecimiento, así como producir regresión tumoral. Una cantidad eficaz para el tratamiento de una enfermedad significa la cantidad
- 15 que, cuando se administra a un mamífero que lo necesite, es suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha definido anteriormente, para dicha enfermedad. Los antagonistas del IGF-IR y el antagonista del PDGFR α de la invención se pueden administrar solos, en combinación unos con otros o en combinación con uno o más agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radiológico.
- Puede ser deseable determinar el nivel de expresión del IGF-IR y/o PDGFR α en un tumor que se va a tratar. En dichos casos, las biopsias tumorales se pueden recoger y analizar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En otro aspecto, un antagonista del PDGFR α se administra en base a que el receptor correspondiente normalmente se expresa o se activa en un tipo de tumor concreto o invariablemente se expresa o activa a medida que la enfermedad progresa.
- 25 Un antagonista del IGF-IR puede ser un antagonista extracelular o un antagonista intracelular y se puede usar más de un antagonista. Los antagonistas extracelulares incluyen, entre otros, proteínas u otras moléculas biológicas que se unen al IGF-IR o uno o más de sus ligandos (p. ej., IGF-I e IGF-II son ligandos naturales del IGF-IR). Un antagonista extracelular inhibe la unión de IGF-IR a sus ligandos. El antagonista puede ser un anticuerpo anti-IGF-IR, tales como, por ejemplo, IMC-A12. Como alternativa, el antagonista es un fragmento soluble de unión al ligando del IGF-IR. Los antagonistas intracelulares del IGF-IR pueden ser moléculas biológicas pero normalmente son moléculas pequeñas. Ejemplos incluyen, entre otros, inhibidor de la tirosina cinasa AG1024 (Calbiochem), el inhibidor de la cinasa receptora del factor I de crecimiento de tipo insulina FNP-AEW54 1 (Novartis) y el factor de crecimiento I de tipo insulina/inhibidor del receptor de la insulina BMS-554417 (Bristol Myers Squibb). Se apreciará que moléculas pequeñas útiles para usar son inhibidores del IGF-IR, pero no tienen que ser completamente específicas del IGF-IR.
- 30 Los anticuerpos anti-IGF-IR a usar exhiben una o más de las propiedades siguientes.
- 35 1) los anticuerpos se unen al dominio externo del IGF-IR e inhiben la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR. La inhibición se puede determinar mediante, por ejemplo, un ensayo de unión directa usando receptor purificado o unido a la membrana. A este respecto, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se unen preferentemente al IGF-IR con al menos la misma fuerza que los ligandos naturales del IGF-IR (IGF-I e IGF-II).
- 45 2) Los anticuerpos neutralizan el IGF-IR. La unión del ligando, por ejemplo IGF-I o IGF-II, a un dominio extracelular externo del IGF-IR estimula la autofosforilación de la subunidad beta y las moléculas de señalización cadena abajo, incluyendo MAPK, Akt e IRS-1.
- La neutralización de IGF-IR incluye la inhibición, disminución, inactivación y/o alteración de una o más de estas actividades, normalmente asociadas con la transducción de señal. La neutralización se puede determinar *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando, por ejemplo, tejidos, células cultivadas o componentes celulares purificados. La neutralización incluye la inhibición de heterodímeros de IGF-IR /IR, así como homodímeros de IGF-IR. Por tanto, la neutralización del IGF-IR tiene varios efectos, incluidos inhibición, disminución, inactivación y/o alteración del crecimiento (proliferación y diferenciación), angiogénesis (reclutamiento de los vasos sanguíneos, invasión y metástasis) y motilidad celular y metástasis (adhesión y capacidad de invasión de las células).
- 50 Una medida de la neutralización del IGF-IR es la inhibición de la actividad tirosina cinasa del receptor. La inhibición de la actividad tirosina cinasa se puede determinar usando procedimientos bien conocidos; por ejemplo midiendo el nivel de autofosforilación del receptor de la cinasa recombinante y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. Por tanto, los ensayos de fosforilación son útiles en la determinación de anticuerpos neutralizantes en el
- 55

contexto de la presente invención. La fosforilación se puede detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo específico de la fosfotirosina en un ensayo ELISA o en una transferencia tipo western. Algunos ensayos para la actividad tirosina cinasa se describen en Panek y col., J. Pharmacol. Exp. Thera. 283: 1433-44 (1997) y Batley y col., Life Sci. 62:143-50 (1998). Dichos anticuerpos producen una disminución en la fosforilación de la tirosina del IGF-IR de al menos aproximadamente un 75%, preferentemente al menos aproximadamente un 85% y, más preferentemente, al menos aproximadamente un 90% en las células que responden al ligando.

Otra medida de neutralización del IGF-IR es la inhibición de la fosforilación de los sustratos cadena debajo de IGF-IR. De acuerdo con esto se puede medir el nivel de fosforilación de MAPK, Akt, o IRS-1. La disminución de la fosforilación es de al menos aproximadamente un 40% y puede ser de al menos aproximadamente un 60% o de al menos aproximadamente un 80%.

Además, se pueden usar procedimientos para la detección de la expresión de proteínas para determinar la neutralización del IGF-IR, en los que la actividad tirosina cinasa de la IGF-IR. Estos procedimientos incluyen inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de la expresión de proteínas, hibridación con fluorescencia in situ (FISH) para la detección de la amplificación génica, ensayos de unión competitiva con radioligando, técnicas de transferencia en matriz sólida, tales como transferencias Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y ELISA. Véase, por ejemplo, Grandis y col., Cancer, 78:1284-92 (1996); Shimizu y col., Japan J. Cancer Res., 85:567-71(1994); Sauter y col., Am. J. Path., 148:1047-53 (1996); Collins, Glia, 15:289-96 (1995); Radinsky y col., Clin. Cancer Res. 1:19-31 (1995); Petrides y col., Cancer Res. 50:3934-39 (1990); Hoffmann y col., Anticancer Res. 17:4419-26 (1997); Wikstrand y col., Carrcer Res. 55:3140-48 (1995).

También se pueden usar ensayos *ex vivo* para determinar la neutralización del IGF-IR. Por ejemplo, mediante ensayos con mitógenos se puede observar inhibición de la tirosina cinasa del receptor usando líneas celulares estimuladas con el ligando del receptor en presencia y ausencia de inhibidor. La línea de cáncer de mama MCF7 (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD) es una línea celular tal que expresa IGF-IR y es estimulada por IGF-I o IGF-II. Otro procedimiento implica analizar la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan IGF-IR o células transfectadas para expresar IGF-IR. También se puede observar inhibición usando modelos tumorales, por ejemplo células tumorales humanas inyectadas en un ratón.

Los anticuerpos de la presente divulgación no están limitados por ningún mecanismo concreto de neutralización del IGF-IR. Los anticuerpos anti-IGF-IR se pueden unir externamente al receptor del EGF de la superficie celular, bloquear la unión del ligando (p. ej., IGF-I o IGF-II) y la posterior transducción de la señal medida por la tirosina cinasa asociada al receptor y prevenir la fosforilación del IGF-IR y otras proteínas cadena abajo en la cascada de la transducción de señal.

3) Los anticuerpos modulan por disminución el IGF-IR. La cantidad de IGF-IR presente sobre la superficie de una célula depende de la producción, internalización y degradación de la proteína receptora. La cantidad de IGF-IR presente sobre superficie de una célula se puede medir de forma indirecta detectando internalización del receptor o una molécula unida al receptor. Por ejemplo, la internalización del receptor se puede medir poniendo en contacto células que expresan IGF-IR con un anticuerpo marcado. Después, el anticuerpo unido a membrana se raspa, recoge y cuenta. El anticuerpo internalizado se determina lisando las células y detectando el marcador en los lisados.

Otro modo es medir directamente la cantidad del receptor presente sobre la célula siguiendo el tratamiento con un anticuerpo anti-IGF-IR u otra sustancia, por ejemplo mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia de células teñidas para la expresión en superficie del IGF-IR. Las células teñidas se incuban a 37°C y la intensidad de fluorescencia se mide en el tiempo. Como control, parte de la población teñida se puede incubar a 4°C (condiciones bajo las cuales se detiene la internalización del receptor).

El IGF-IR de la superficie celular se puede detectar y medir usando un anticuerpo diferente que sea específico de IGF-IR y que no bloquea ni compite con la unión del anticuerpo que se está analizando. (Burtrum, y col., Cancer Res. 63:8912-21 (2003)) El tratamiento de una célula que expresa IGF-IR con un anticuerpo tienen como resultado la reducción del IGF-IR en la superficie celular. La reducción es de al menos aproximadamente un 70%, más preferentemente al menos aproximadamente un 80% e incluso más preferentemente al menos al menos aproximadamente un 90% en respuesta al tratamiento con un anticuerpo de la invención. Se puede observar una disminución significativa en tan solo cuatro horas.

Otra medida de la modulación por disminución es la reducción de la proteína receptora total presente en una célula y releja la degradación de los receptores internos. De acuerdo con lo anterior, el tratamiento de células (en particular células cancerosas) con dichos anticuerpos tiene como resultado una reducción del IGF-IR celular total. La reducción es de al menos aproximadamente un 70%, más preferentemente de al menos aproximadamente un 80% e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente un 90%.

Para el tratamiento de sujetos humanos, los anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación son, preferentemente, humanos. Como alternativa, los anticuerpos pueden proceder de primates no humanos u otros mamíferos o ser anticuerpos humanizados o quiméricos. Un anticuerpo anti-IGF-IR puede comprender una, dos,

tres, cuatro, cinco y/o seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N° 35, SEC ID N°:37, SEC ID N°:39, SEC ID N°:45, SEC ID N°:47, y SEC ID N°:49 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). Como alternativa, el anticuerpo anti-IGF-IR puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N° 35, SEC ID N°:37, SEC ID N°:39, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 57 y SEC ID N°: 59 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). Preferentemente, dichos anticuerpos (o fragmentos de los mismos) tienen CDR de cadena pesada de SEC ID N° 35, SEC ID N° 37 y SEC ID N° 39. Como alternativa, y también preferentemente, los presentes anticuerpos que incluyen fragmentos de los mismos tienen CDR de cadena ligera de SEC ID N°:45, SEC ID N°:47 y SEC ID N°:49 o SEC ID N°:55, SEC ID N°:57 y SEC ID N°:59. Uno de estos anticuerpos anti-IGF-IR es el anticuerpo IgG1 humano IMC-A12 (WO2005016970 que tiene un dominio variable de cadena pesada representado por la SEC ID N°:41 y un dominio variable de cadena ligera representado por la SEC ID N°:51. Otro anticuerpo humano preferido es IMC-2F8 (WO2005016970), que tiene un dominio variable de cadena pesada idéntico a IMC-A12 y un dominio variable de cadena ligera representado por la SEC ID N°:61. Anticuerpos útiles incluyen además anticuerpos anti-IGF-IR que compiten con IMC-A12 o IMC-2F8 por la unión a IGF-IR, así como anticuerpos que se unen a otros epítopos (es decir, anticuerpos que se unen a otros epítopos y que exhiben propiedades que anteriormente se han descrito tales como bloqueo de ligando, internalización del receptor etc., pero no compiten con IMC-A12 o IMC-2F8).

De acuerdo con la presente divulgación también se pueden usar para tratamiento antagonistas de PDGFR α . Un antagonista del PDGFR α puede ser un antagonista extracelular o un antagonista intracelular y se puede usar más de un antagonista. Los antagonistas extracelulares incluyen, entre otros, proteínas u otras moléculas biológicas que se unen a PDGFR α o uno o más de sus ligandos (p. ej., PDGF-AA, -AB, -BB, -CC). Preferentemente, un antagonista extracelular inhibe la unión de PDGFR α a sus ligandos. En una realización, el antagonista es un anticuerpo anti-PDGFR α , tal como, por ejemplo, IMC-3G3. Como alternativa, la proteína de unión es un fragmento de unión a ligando soluble de PDGFR α . Los antagonistas de IGF-IR intracelulares pueden ser moléculas biológicas, pero normalmente son moléculas pequeñas. El antagonista de PDGFR α intracelular es AG1296. AG1296 (Calbiochem) es un inhibidor de PDGF α , PDGF β s, y c-KIT, y también reacciona con Flt3. Otras moléculas pequeñas dirigidas a PDGFR incluyen STI-571 (mesilato de imatinib, Gleevec®, Novartis) y SU11248 (malato de sunitinib, SUTENT®, Pfizer).

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-PDGFR α comprende seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) constituidas por las SEC ID N° 2, SEC ID N°:4, SEC ID N°:6, SEC ID N°:10, SEC ID N°:12, y SEC ID N°:14 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). Preferentemente, los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la presente invención tienen CDR de SEC ID N°:2, SEC ID N°:4 y SEC ID N°:6. Como alternativa, y también preferentemente, los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, tienen CDR de las SEC ID N°:10, SEC ID N°:12 y SEC ID N°:14. Las secuencias de aminoácidos de las CDR se exponen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 –CDR de IMC-3G3

<u>Cadena pesada</u>		
CDR1	SSSY	SEC ID N°:2
CDR2	SFFYTGSTYYNPSLR	SEC ID N°:4
CDR3	QSTYYYGSGNYYGWFD	SEC ID N°:6
<u>Cadena ligera</u>		
CDR1	RASQSVSSYLA	SEC ID N°:10
CDR2	DASNRAT	SEC ID N°:12
CDR3	QQRSNWPPA	SEC ID N°:14

En otra realización, el anticuerpo anti-PDGFR α , o fragmento del mismo, tiene una región variable de cadena pesada humana de SEC ID N° 8 y/o una región variable de cadena ligera humana de SEC ID N° 16. El IMC-3G3 es un anticuerpo de este tipo y se ilustra en la presente invención.

Preferentemente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención neutralizan el PDGFR α . La unión de un ligando, por ejemplo ., PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB o PDGF-CC, a un dominio extracelular externo de PDGFR α estimula la dimerización del receptor, la autofosforilación, la activación del dominio citoplasmático

- interno de la tirosina cinasa y el inicio de múltiples vías de transactivación y transducción de la señal implicadas en la regulación de la síntesis del ADN (activación génica) y la progresión del ciclo celular o la división. Los anticuerpos anti-PDGFR α normalmente bloquean la unión del ligando y/o la dimerización del receptor e inhiben uno o más de autofosforilación, activación de la actividad tirosina cinasa y transducción de la señal. Los anticuerpos anti-PDGFR α de la presente invención pueden ser específicos de la región de unión al ligando extracelular de PDGFR α y evitarán la unión de un ligando de PDGFR α . Preferentemente, dichos anticuerpos anti-PDGFR α , o fragmentos de los mismos, se unen a PDGFR α con al menos la misma fuerza que los ligandos naturales de PDGFR α . Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos pueden ser específicos de una región del monómero receptor que, de otro modo, formaría una interfaz receptor dímero. Dichos anticuerpos bloquean la formación de dímero, aunque la unión del ligando a un monómero receptor podría o no estar bloqueada.
- Como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos anti-IGF-IR, la neutralización del receptor se puede determinar mediante varios procedimientos *in vivo*, *in vitro*, y *ex vivo*. Los anticuerpos anti-PDGFR α reducen la fosforilación de PDGFR α en al menos aproximadamente un 75%. Preferentemente, la fosforilación se reduce en al menos aproximadamente un 85% o al menos aproximadamente un 90 %. Como resultado de la inhibición de PDGFR α , la transducción de señal, la fosforilación o un componente de la vía de la transducción de señal cadena abajo (p. ej., Akt, p42/p44, etc.) se reduce en al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 60% o al menos aproximadamente un 80%. La neutralización del receptor se puede determinar usando ligandos definidos (p. ej., PDGF-AA, -AB, -BB, -CC), mezclas de dichos ligandos o preparaciones tales como aspirados de médula ósea que comprenden PDGF así como otros factores de crecimiento estimuladores.
- La neutralización de PDGFR α incluye la inhibición, disminución, inactivación y/o alteración de una o más de estas actividades, normalmente asociadas con la transducción de señal. Por tanto, la neutralización del PDGFR α tiene varios efectos, incluidos inhibición, disminución, inactivación y/o alteración del crecimiento (proliferación y diferenciación), angiogénesis (reclutamiento de los vasos sanguíneos, invasión y metástasis) y motilidad celular y metástasis (adhesión y capacidad de invasión de las células).
- También se pueden usar ensayos *ex vivo* como se han descrito anteriormente para determinar la neutralización del PDGFR α . Por ejemplo, se pueden usar células de leiomiosarcoma SKLMS-1 humanas (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC HTB-88™) o células de glioblastoma U118 (ATCC HTB-15™) estimuladas con PDGF-AA para investigar la inhibición del PDGFR α . La inhibición del crecimiento se puede determinar usando células tumorales humanas que expresan PDGFR α inyectadas en un ratón SCID.
- La presente invención no está limitada por ningún mecanismo concreto de neutralización del PDGFR α . Los anticuerpos anti-PDGFR α de la presente invención se unen externamente al receptor PDGFR α de la superficie celular, bloquear la unión del ligando (p. ej., PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC) , inhibir la fosforilación del PDGFR α , inhibir la transducción de señal mediada por la tirosina cinasa asociada al receptor y modular la actividad de los componentes de la transducción de señal cadena abajo. El complejo anticuerpo-receptor también se puede internalizar y degradar, lo que tiene como resultado la regulación por disminución del receptor de la superficie celular. Las metaloproteinasas de la matriz, que funcionan en la invasión y metástasis de las células tumorales también se pueden regular por disminución mediante los anticuerpos de la presente invención. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden exhibir inhibición de la producción del factor de crecimiento y la angiogénesis.
- Como se ha descrito anteriormente, los antagonistas de PDGFR α de la invención son útiles para tratar tumores óseos, incluyendo tumores óseos metastásicos. Otros tipos tumorales que expresan PDGFR α y que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen, entre otros, tumores de ovarios, tumores de mama, tumores de pulmón, tumores hepatocelulares, tumores estromales gastrointestinales, melanomas, carcinomas de células renales, tumores de la próstata y sarcomas de tejidos blandos. Los sarcomas de tejidos blandos se originan en tejidos tales como grasa, músculos, nervios, tendones y vasos sanguíneos y linfáticos. Normalmente, las células tumorales sobreexpresan PDGFR α . La expresión de PDGFR α se puede determinar mediante, por ejemplo, histoquímica o análisis de ARN. Por ejemplo, un análisis de scatchard de la unión de IMC-3G3 marcado radiactivamente a células U118 y células tumorales SKLMS-1 indica que el número de moléculas de PDGFR α sobre las células era de aproximadamente 500 y 2.500, respectivamente.
- Los antagonistas de PDGFR α funcionan inhibiendo la transducción de señal por el PDGFR α expresado sobre las propias células tumorales o inhibiendo el PDGFR α expresado sobre las células estromales circundantes que, de otro modo, sufren estimulación paracrina por los PDGF expresadas de células tumorales. Por tanto, los anticuerpos tales como IMC-3G3 y otros antagonistas de PDGFR α son útiles para tratar tumores caracterizados por estimulación autocrina y/o paracrina de PDGFR α .
- Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención se pueden producir escindiendo un anticuerpo entero o expresando ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar mediante procedimientos descritos por Lamoyi y col., J. Immunol. Methods, 56: 235-243 (1983) y por Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983). Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Dichos fragmentos pueden también contener anticuerpos con la región variable del fragmento de una cadena, es decir scFv, diacuerpos u otros fragmentos de anticuerpo. Los procedimientos de producir dichos equivalentes

funcionales se divulgan en la solicitud de PCT WO 93/21319, la solicitud de patente europea nº EP 239400; la solicitud de PCT WO 89/09622; la solicitud de patente europea nº EP 338745; y la solicitud de patente europea EP 332424.

5 Células huésped preferidas para la transformación de vectores y expresión de los anticuerpos de la presente invención son células de mamífero, por ejemplo células COS-7, células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares de origen linfoide tales como linfoma, mieloma (p. ej., NS0) o células de hibridoma. Como alternativa se pueden usar otros huéspedes eucarióticos, tales como levaduras.

10 Cuando se desee expresar una construcción génica en levaduras, un gen de selección adecuado para usar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7. Stinchcomb y col. *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman y col., *Gene*, 7: 141 (1979). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de daños en *trp1* en el genoma de la célula huésped levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levaduras deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

20 Las células huésped transformadas se cultivan mediante procedimientos conocidos en la técnica en un medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono (hidratos de carbono, tales como glucosa o lactosa), nitrógeno (aminoácidos, péptidos, proteínas o sus productos de degradación tales como peptonas, sales de amonio o similares) y sales inorgánicas (sulfatos, fosfatos y/o carbonatos de sodio, potasio, magnesio y calcio). El medio contiene además, por ejemplo, sustancias de estimulación del crecimiento, tales como oligoelementos, por ejemplo hierro, cinc, manganeso y similares.

25 Se pueden aislar anticuerpos anti-PDGFR α y anticuerpos anti-IGF-IR de alta afinidad de acuerdo con la presente divulgación a partir de una biblioteca de expresión en fagos construida con los genes de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera humanas. Por ejemplo, se puede obtener un dominio variable a partir de un linfocito de sangre periférica que contiene un gen reordenado de la región variable. Como alternativa se pueden obtener porciones del dominio variable, tales como regiones CDR y FW, de diferentes fuentes y recombinadas. Además, las porciones de los dominios variables (p. ej., regiones FW) pueden ser secuencias consenso sintéticas.

30 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden obtener, por ejemplo, de anticuerpos naturales o de bibliotecas de expresión en fagos de Fac o scFv. Se entiende que, para fabricar un anticuerpo de dominio único a partir de un anticuerpo que comprende un dominio VH y uno VL, se puede desear ciertas sustituciones de aminoácidos fuera de las CDR para potenciar la unión, la expresión o la solubilidad. Por ejemplo, puede ser deseable modificar residuos de aminoácidos que, de otro modo, estarían enterrados en la interfaz V_H-V_L.

35 Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden obtener mediante tecnología de hibridoma estándar (Harlow & Lane, ed., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que se incorpora por referencia en el presente documento) usando ratones transgénicos (p. ej., ratones KM de Medarex, San Jose, Calif.) que producen las cadenas ligera kappa y pesada gamma de inmunoglobulina humana. Preferentemente, una porción sustancial del genoma productor del anticuerpo humano se inserta en el genoma del ratón y se convierte en deficiente en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Dichos ratones pueden inmunizarse por vía subcutánea (s.c.) con PDGFR α (normalmente en adyuvante completo de Freund) con refuerzos según sea necesario. En la técnica se conocen bien los procedimientos de inmunización.

45 La proteína usada para identificar los anticuerpos de unión a IGF-IR es, preferentemente, IGF-IR y, más preferentemente, es el dominio extracelular de IGF-IR. La proteína usada para identificar anticuerpos de unión a PDGFR α de la invención es, preferentemente, PDGFR α y, más preferentemente, es el dominio extracelular de PDGFR α . Dichos dominios extracelulares pueden estar libres o conjugados con otras moléculas.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos anteriormente. Detalles del anticuerpo anti-IGF-IR IMC-A12 se divulgan en el documento WO2005016970. La tabla 2 expone las secuencias de ácido nucleico para IMC-3G3.

Tabla 2 – Secuencias de nucleótidos que codifican CDR de IMC-3G3

Cadena pesada

CDR1	agtagtagtt actac	SEC ID N°:1
CDR2	agtttctttt atactgggag cacctactac aaccctccc tcaggagt	SEC ID N°:3
CDR3	cagtccacgt attactatgg ttccgggaat tattatggct gggtcgaccg c	SEQ IS NO:5

Cadena ligera

CDR1	agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc	SEC ID N°:9
CDR2	gatgcatcca acagggccac t	SEC ID N°:11
CDR3	cagcagcgta gcaactggcc tccggcg	SEC ID N°:13

5 Se puede preparar ADN que codifica anticuerpos humanos mediante recombinación de ADN que codifica regiones constantes y regiones variables humanas, distintas de las CDR, derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y ADN que codifica las CDR derivadas de ser humano (SEC ID N° 1, 3 y 5 para las CDR de dominio variable de cadena pesada y las SEC ID N° 9, 11 y 14 de las CDR de dominio variable de cadena ligera).

10 Fuentes adecuadas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como hibridomas y esplenocitos que expresan al anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos se pueden usar por sí mismos como equivalentes de anticuerpos o se pueden recombinar en equivalentes, como se ha descrito anteriormente. Las deleciones y recombinaciones de ADN descritas en esta sección se pueden llevar a cabo mediante procedimientos conocidos, tales como los descritos en las publicaciones enumeradas anteriormente con respecto a los equivalentes de anticuerpos y/u otras técnicas de ADN recombinante estándar, como las que se describen más adelante. Otra fuente de ADN son anticuerpos de cadena sencilla producidos de una biblioteca de expresión en fagos, como se conoce en la técnica.

15 Adicionalmente, la presente invención proporciona vectores de expresión que contienen las secuencias polinucleotídicas descritas anteriormente unidas operablemente a una secuencia de expresión, un promotor y una secuencia potenciadora. Se han desarrollado varios vectores de expresión para la síntesis eficaz del polipéptido de anticuerpo en sistemas procariontes, tales como bacterias, y eucariotas, incluidos, entre otros, sistemas de cultivo celular en levaduras y mamíferos. Los vectores de la presente invención pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético.

20 Se puede ser cualquier vector de expresión adecuado. Por ejemplo, los vectores de clonación procariontes incluyen plásmidos de *E. coli*, tales como *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM* y *RP4*. Los vectores procariontes también incluyen derivados de ADN de fago, tales como M13 y otros fagos de ADN monocatenario filamentosos. Un ejemplo de un vector útil en levaduras es el plásmido 2μ . Vectores adecuados para la expresión en células de mamífero incluyen derivados bien conocidos de SV40, adenovirus, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores lanzadera derivadas de la combinación de vectores funcionales de mamífero, tales como los descritos anteriormente, y plásmidos funcionales y ADN de fago.

25 En la técnica se conocen otros vectores de expresión eucariota (p. ej., P.J. Southern y P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341 (1982); Subramani y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1: 854-864 (1981); Kaufmann y Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," *J. Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982); Kaufmann y Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159, 601-664 (1982); Scchill y col., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 80, 4654-4659 (1983); Urlaub and Chasin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77 4216-4220, (1980).

30 Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está unida operablemente a la secuencia de ADN o fragmento que se va a expresar. La secuencia control se inserta en el vector con el fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonado. Ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *trc*, las principales regiones de operador y promotor del fago lambda, la región control de la proteína de cubierta fd, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levaduras, por ejemplo Pho5, los promotores de los factores de acoplamiento alfa de levaduras y los promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo los promotores tempranos y tardíos o SV40 y las otras secuencias de las que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariontes y eucariotas y sus virus, o combinaciones de las mismas.

35 La presente invención también proporciona células huésped recombinantes que contienen los vectores de expresión que se han descrito anteriormente. Los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar en líneas celulares distintas a los hibridomas. Se pueden usar ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada.

50 Las líneas celulares de preferencia concreta se seleccionan en base al nivel de expresión elevado, la expresión

constitutiva de la proteína de interés y la contaminación mínima de las proteínas huésped. En la técnica se conocen bien líneas de células de mamífero disponibles como huéspedes e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, entre otras, células NS0, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster neonato (BHK) y muchas otras. Células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levaduras y otros hongos. Huéspedes procariotas útiles incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tales como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*.

Estas células huésped recombinantes presentes se pueden usar para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, cultivando las células en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo y purificando el anticuerpo o fragmento del mismo de la célula huésped o del medio que rodea a la célula huésped. Dirigir el anticuerpo expresado o fragmento para la secreción en las células huésped recombinantes se puede facilitar insertando una secuencia que codifica una señal o péptido líder secretor (véase Shokri y col., Appl Microbiol Biotechnol. 60(6):654-64 (2003), Nielsen y col., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids Res. 14:4683-4690 (1986)) en el extremo 5' del gen de interés que codifica el anticuerpo. Estos elementos de péptido líder secretor pueden derivar de secuencias procarióticas o eucarióticas. De acuerdo con esto se usan adecuadamente péptidos líder secretores, siendo aminoácidos unidos al extremo N terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido hacia fuera del citosol de la célula huésped y la secreción en el medio.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden fusionar con residuos de aminoácidos adicionales. Dichos residuos de aminoácidos pueden ser una cola peptídica, quizá para facilitar el aislamiento. También se contemplan otros residuos de aminoácidos para dirigir los anticuerpos a órganos o tejidos específicos.

Preferentemente, se fabrica un anticuerpo de la presente invención expresando un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en un animal transgénico, de modo que el anticuerpo se expresa y se puede recuperar. Por ejemplo, el anticuerpo se puede expresar de un modo específico de tejido que facilita la recuperación y purificación. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se expresa en la glándula mamaria para secreción durante la lactancia. Los animales transgénicos incluyen, entre otros, ratones, cabra y conejos.

Anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen inmunoglobulinas completas, fragmentos de unión a antígeno de inmunoglobulinas, así como proteínas de unión a antígeno que comprenden dominios de unión a antígeno de inmunoglobulinas. Los fragmentos de unión a antígeno de inmunoglobulinas incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', and F(ab')₂. Se han desarrollado otros formatos de anticuerpos que conservan especificidad de unión pero que tienen otras características que pueden ser deseables, incluyendo, por ejemplo, biespecificidad, multivalencia (más de dos sitios de unión), tamaño compacto (p. ej., dominios de unión solos).

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de parte o de todos los dominios constantes de los anticuerpos enteros de los que derivan. Por tanto, se pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos enteros. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienen a carecer de determinadas interacciones indeseadas entre las regiones constantes de las cadenas pesadas y otras moléculas biológicas. Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y pueden tener una permeabilidad mayor que los anticuerpos enteros, lo que permite que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno diana con mayor eficacia. Además, el tamaño relativamente pequeña de los anticuerpos de cadena sencilla hace que sea menos probable que provoquen en un receptor una respuesta inmunitaria indeseada que los anticuerpos enteros.

Los anticuerpos de cadena sencilla múltiples en los que cada cadena sencilla tiene un dominio V_H y uno V_L unidos covalentemente por un primer ligador peptídico pueden estar unidos covalentemente por al menos uno o más ligadores peptídicos formando anticuerpos de cadena sencilla multivalentes, que pueden ser monoespecíficos o multispecíficos. Cada cadena de un anticuerpo de una cadena sencilla multivalente incluye un fragmento de región variable de cadena ligera y un fragmento de región variable de cadena pesada, y está unido por un ligador peptídico a al menos otra cadena. El ligador peptídico está compuesto por al menos quince residuos de aminoácidos. El número máximo de residuos de aminoácidos es de aproximadamente cien.

Dos anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar formando un diacuerpo, también conocido como dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio V_H conectado a un dominio V_L. Los dominios están conectados con ligadores lo bastante cortos para prevenir el emparejamiento entre los dominios en la misma cadena, de modo que se fuerza el emparejamiento a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.

Tres anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar formando triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el extremo aminoácido de un dominio V_L o V_H directamente condensado al extremo carboxilo de un dominio V_L o V_H, es decir sin ninguna secuencia ligadora. El triacuerpo tiene tres cabezas F_v con los polipéptidos dispuestos de un modo cíclico y de cabeza a cola. Una conformación posible del triacuerpo es planar con los tres sitios de unión localizados en un plano en un ángulo de 120 grados uno de otro. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o trispecíficos.

Por tanto, los anticuerpos de la invención y fragmentos de los mismos incluyen, entre otros, anticuerpos de origen natural, fragmentos bivalentes tales como (Fab')₂, fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos de una cadena, Fv de una cadena (scFv), anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos cadena sencilla multivalentes, diacuerpos, triacuerpos y similares, que se unen específicamente a los antígenos.

5 Los anticuerpos anti-IGF-IR y anti-PDGFR α o fragmentos de anticuerpos que se pueden internalizar tras la unión a células portadoras de IGF-IR (documento WO2005016970) o PDGFR α , pueden estar unidos química o biosintéticamente a agentes antitumorales. Los agentes antitumorales unidos a dicho anticuerpo incluye cualquier agente que destruya o dañe un tumor al que el anticuerpo se ha unido o en el entorno de la célula a la que se ha unido el anticuerpo. Por ejemplo, un agente antitumoral es un agente tóxico tal como un agente quimioterapéutico o un radioisótopo. Los expertos en la técnica conocen los agentes quimioterapéuticos adecuados e incluyen antraciclinas (p. ej., daunomicina y doxorubicina), metotrexato vindesina neocarzinostatina, cis-platino, clorambucilo, citosina arabinósido, 5-fluorouridina, melfalán, ricina y caliqueamicina. Los agentes quimioterapéuticos se conjugan con el anticuerpo usando procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Hermentin and Seiler, Behring Inst. Mitt. 82:197-215(1988)).

15 Los expertos en la técnica también conocen radioisótopos adecuados para usar como agentes antitumorales. Por ejemplo, se usan ¹³¹I o ²¹¹At. Estos isótopos se unen al anticuerpo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Pedley y col., Br. J. Cancer 68, 69-73(1993)).

20 Como alternativa, el agente antitumoral que se une al anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. De este modo se administra un profármaco que permanece en su forma inactiva hasta que alcanza el sitio diana en el que se convierte en su forma de citotoxina. En la práctica, el conjugado anticuerpo-enzima se administra al paciente y se deja localizar en la región del tejido que se va a tratar. Después, el profármaco se administra al paciente de un modo tal que se produce la conversión del fármaco citotóxico en la región del tejido que se va a tratar.

25 Otros agentes antitumorales incluyen citocinas tales como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo dirige la citocina al tumor de modo que la citocina participa en el daño o la destrucción del tumor sin afectar a otros tejidos. La citocina se puede conjugar con el anticuerpo a nivel de ADN usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

30 En determinados aspectos se administran anticuerpos anti-IGF-IR o anti-PDGFR α en combinación con uno o más agentes antineoplásicos. Para ejemplos de terapias de combinación, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.217.866 (Schlessinger y col.). (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con agentes antineoplásicos; documento WO 99/60023 (Waksal y col. (anticuerpos anti-EGFR en combinación con radiación). Se puede usar cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico, radiación o combinaciones de los mismos. El agente antineoplásico puede ser un agente alquilante o un anti-metabolito. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, entre otros, cisplatino, ciclofosfamida, melfalán y dacarbazina. Ejemplos de anti-metabolitos incluyen, entre otros, doxorubicina, daunorubicina y paclitaxel, gemcitabina.

35 Agentes antineoplásicos útiles también incluyen inhibidores de la mitosis, tales como taxanos, docetaxel y paclitaxel. Los inhibidores de topoisomerasa son otra clase de agentes antineoplásicos que se pueden usar en combinación con anticuerpos de la invención. Estos incluyen inhibidores de la topoisomerasa I o de la topoisomerasa II. Inhibidores de la topoisomerasa I incluyen irinotecán (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecán. Inhibidores de la topoisomerasa II incluyen etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26). En la actualidad se están evaluando otras sustancias con respecto a la actividad inhibidora de la topoisomerasa y la eficacia como agentes antineoplásicos. Preferentemente, el inhibidor de la topoisomerasa es irinotecán (CPT-11).

40 En un aspecto concreto se administra un anticuerpo anti-IGF-IR en combinación con docetaxel. En otra realización de la invención se administra un anticuerpo anti-PDGFR α en combinación con doxorubicina.

45 Cuando el agente anti-neoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser externa (radioterapia con haz externo-EBRT) o interna (braquiterapia-BT) al paciente que se esté tratando. La dosis del agente antineoplásico administrado depende de numerosos factores, incluidos, por ejemplo, el tipo de agentes, el tipo y gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración del agente. No obstante, debe destacarse que la presente invención no está imitada a ninguna dosis concreta.

50 Los tratamientos con anticuerpo (anti-IGF-IR o anti-PDGFR α) y anticuerpo más agente antineoplásico también se pueden usar para pacientes que reciben tratamiento hormonal adyuvante (p. ej., para cáncer de mama) o tratamiento de privación de andrógenos (p. ej., para cáncer de próstata).

55 Los antagonistas anti-IGF-IR y anti-PDGFR α se pueden coadministrar o administrar con antagonistas del receptor que neutralizan otros receptores implicados en el crecimiento del tumor o la angiogénesis. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-IR y un anticuerpo anti-PDGFR α se coadministran. En un aspecto en el que una célula tumoral diana expresa IGF-IR y PDGFR α , los elementos de transducción de la señal comunes se activan mediante transducción de señal a través de cada receptor. Aunque la inhibición de un receptor generalmente tendrá como resultado una activación mejor de los componentes cadena abajo comunes, la inhibición de ambos receptores disminuirá la activación posterior. En otro aspecto, determinadas células en un tumor o un tejido que rodea al tumor

expresan cantidades significativas de un receptor y otras células expresan cantidades significativas del segundo receptor. La coadministración de los antagonistas reduce el crecimiento de las células tumorales y la estimulación paracrina de las células adyacentes.

Se puede proporcionar un anticuerpo biespecífico como alternativa a la coadministración. Existen diversos anticuerpos biespecíficos que se han diseñado para incorporar varias características deseables. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos tienen un tamaño mínimo. Los anticuerpos biespecíficos con cuatro sitios de unión a antígeno (dos para cada especificidad de unión) tienen actividades de unión que son similares a las de los correspondientes anticuerpos de origen natural. Determinados anticuerpos biespecíficos incorporan regiones Fc, de modo que conservan las funciones efectoras (p. ej., citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) de anticuerpos de origen natural. El documento WO 01/90192 describe anticuerpos tetravalentes de tipo IgG. El documento WO2006/020258 describe un anticuerpo tetravalente que incorpora dos diacuerpos y conserva sus funciones efectoras.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-IGF-IR o un anticuerpo anti-PDGFR α u otro antagonista se usa en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., EGFR, Her2/erbB2, erbB3, erbB4). Particularmente preferidas son las proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de EGFR y bloquean la unión de uno o más de sus ligandos y/o neutralizan la activación inducida por ligando de EGFR. Los antagonistas de EGFR también incluyen anticuerpos que se unen a un ligando de EGFR e inhibe la unión de EGFR a su ligando. Los ligandos del EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- α , anfiregulina, EGF de unión a la heparina (HB-EGF) y betacelulina. Se piensa que EGF y TGF- α son los principales ligandos endógenos que tienen como resultado la estimulación mediada por EGFR, aunque se ha demostrado que el TGF- α es más potente en la estimulación de la angiogénesis. Los antagonistas del EGFR también incluyen sustancias que inhiben la dimerización de EGFR con otras subunidades del receptor de EGFR (es decir, homodímeros de EGFR) o heterodimerización con otros receptores del factor de crecimiento (p. ej., HER2). Los antagonistas del EGFR también incluyen moléculas biológicas y moléculas pequeñas, tales como inhibidores sintéticos de la cinasa, que actúan directamente sobre el dominio citoplásmico del EGFR para inhibir la transducción de señal mediada por EGFR. Erbitux® (cetuximab) es un ejemplo de un antagonista de EGFR que se une a EGFR y bloquea la unión del ligando. Un ejemplo de un antagonista de EGFR de molécula pequeña es IRESSA™ (ZD1939), que es un derivado de quinozalina que funciona como mimético del ATP para inhibir el EGFR. Véase la patente de EE.UU. Nº 5,616,582 (Zeneca Limited); el documento WO 96/33980 (Zeneca Limited) en la pág. 4; véase también, Rowinsky y col., el Resumen 5 presentado en la 37 Reunión Anual de la ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001; Anido y col., el Resumen 1712 presentado en la Reunión Anual de la ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001. Otro ejemplo de antagonista de EGFR de molécula pequeña es TARCEVA™ (OSI-774), que es un derivado de 4-(fenilaminosustituido)quinozalina [6,7-Bis(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]- (3 etinilfenil) amina clorhidrato] inhibidor del EGFR. Véase el documento WO 96/30347 (Pfizer Inc.) en, por ejemplo, página 2, línea 12 a página 4, línea 34 y la página 19, líneas 14-17. Véase también Moyer y col., Cancer Res., 57: 4838-48 (1997); Pollack y col., J. Pharmacol., 291: 739-48 (1999). Tarceva™ puede funcionar mediante la inhibición de la fosforilación del EGFR y sus vías de transducción de señal cadena debajo de PI3/Akt y de la MAP (proteína activada por mitógeno) cinasa que tiene como resultado la detención del ciclo celular mediada por p27. Véase Hidalgo y col., Resumen 281 presentado en la 37 Reunión Anual de la ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001.

También se ha comunicado que otras moléculas pequeñas inhiben el EGFR, muchas de las cuales se piensa que son específicas del dominio tirosina cinasa de un EGFR. Algunos ejemplos de dichos antagonistas de EGFR de molécula pequeña se describen en los documentos WO 91/116051, WO 96/30347, WO 96/33980, WO 97/27199 (Zeneca Limited). Los documentos WO 97/30034 (Zeneca Limited), WO 97/42187 (Zeneca Limited), WO 97/49688 (Pfizer Inc.), WO 98/33798 (Warner Lambert Company), WO 00/18761 (American Cyanamid Company) y WO 00/31048 (Warner Lambert Company). Ejemplos de antagonistas específicos de EGFR de molécula pequeña incluyen CI-1033 (Pfizer), que es un inhibidor quinozalina (N-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinazolin-6-il]-acrilamida) de las tirosina cinasas, particularmente EGFR y se describe en el documento WO 00/31048 en la página 8, líneas 22-6; PKI166 (Novartis), que es un inhibidor de pirrolopirimidina de EGFR y se describe en el documento WO 97/27199 en las páginas 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), que es un inhibidor de EGFR y HER2; EKB569 (Wyeth), que se ha comunicado que inhibe el crecimiento de las células tumorales que sobrexpresan EGFR o HER2 in vitro e in vivo; AG-1478 (Trypsofina), que es una molécula pequeña de quinozalina que inhibe la señalización de EGFR y de erbB-2; AG-1478 (Sugen), que es un inhibidor bisustrato que también inhibe la proteína cinasa CK2; PD 153035 (Parke-Davis), que se ha comunicado que inhibe la actividad de EGFR cinasa y el crecimiento tumoral, induce apoptosis en células en cultivo y potencia la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que es un inhibidor de tirosina cinasa dirigido al tratamiento del cáncer de próstata; CP-546,989 (OSI Pharmaceuticals), que se ha notificado que es un inhibidor de la angiogénesis para el tratamiento de tumores sólidos; ADL-681, que es un inhibidor de EGFR cinasa dirigido al tratamiento de cáncer; PD 158780, que es una pirrolopirimidina que se ha notificado que inhibe la velocidad del crecimiento tumoral de los xenoinjertos A4431 en ratones; CP-358,774, que es una quinozalina que se ha notificado que inhibe la autofosforilación en xenoinjertos HN5 en ratones; ZD1839, que es una quinozalina que se ha notificado que tiene actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón, incluidos cánceres vulvar, NSCLC, de próstata, de ovarios y colorrectal; CGP 59326A, que es una pirrolopirimidina que se ha notificado que inhibe el crecimiento de xenoinjertos positivos a EGFR en ratones; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 y CGP53353 (Novartis), que son

dianilinoftalimidias. Los inhibidores de tirosina cinasa de EGFR naturales incluyen genistéina, herbimicina A, quercetina y erbaestatina.

5 Otras moléculas pequeñas que se ha notificado que inhiben el EGFR son compuestos tricíclicos, tales como los compuestos descritos en la patente de EE.UU. N° 5.679.683; derivados de quinazolina, tales como los derivados descritos en la patente de EE.UU. N° 5.616.582; y compuestos indol tales como los compuestos descritos en la patente de EE.UU. n° 5.196.446.

10 Otro receptor que se puede dirigir junto con IGF-IR o PDGFR α es un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). A este respecto se puede usar un anticuerpo anti-IGF-IR o un anticuerpo anti-PDGFR α en combinación con un antagonista de VEGFR.- Se puede usar un antagonista que se une específicamente al receptor VEGFR-1/Flt-1. Como alternativa, el antagonista de VEGFR se puede unir específicamente al receptor VEGFR-2/KDR. Particularmente preferidas son las proteínas de VEGFR-2 es estimulado con más fuerza por VEGF; VEGFR-1 es estimulado con más dureza por F, pero también por VEGF), y/o neutralizan la activación inducida por ligando. Por ejemplo, IMC-1121 es un anticuerpo humano que se une y neutraliza el VEGFR-2 (documento WO 03/075840; Zhu). Otro ejemplo es el AcMo 6.12 que se une a VEGFR-1 soluble y expresado en la superficie de la célula. El ScFv 6.12 comprende los dominios V_H y V_L del anticuerpo monoclonal de ratón AcMo 6.12. Una línea celular de hibridoma que produce el AcMo 6.12 se ha depositado en el ATCC número PTA-3344 según las disposiciones del Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure y los reglamentos conforme al mismo (Tratado de Budapest). El antagonista de VEGFR se une a un ligando de VEGFR y bloquea la activación de un VEGFR por un ligando. Por ejemplo, Avastin® (bevacizumab) es un anticuerpo que se une a VEGF.

Otros ejemplos de receptores del factor de crecimiento implicados en la tumorigénesis son el factor de crecimiento neural (NGFR) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

25 Como alternativa, los anticuerpos anti-IGF-IR y anti-PDGFR α o se pueden administrar en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citocinas (IL-10 e IL-13, por ejemplo) u otros estimuladores inmunitarios, tales como, entre otros, quimiocinas, antígenos asociados con tumores y péptidos. Véase, *por ejemplo*, Larrivéey col., ant. No obstante, debe apreciarse que la administración de solo un anticuerpo anti-IGF-IR o anti-PDGFR α es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de un modo terapéuticamente eficaz.

30 En una terapia de combinación, el anticuerpo anti-IGF-IR o anti-PDGFR α se administra antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación del mismo, es decir antes y durante, antes y después, durante y después o antes, durante y después de comenzar la terapia con el agente antineoplásico. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar entre 1 y 30 días, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia. Además, la quimioterapia se puede administrar de forma concurrente con, o, más preferentemente después, de la terapia con anticuerpos.

35 En la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento o vía para administrar anticuerpos de la invención y, opcionalmente, para coadministrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Las pautas con agentes antineoplásicos usadas de acuerdo con la invención incluyen cualquier pauta que se crea que es óptimamente adecuada para el tratamiento de la afección neoplásica del paciente. Diferentes neoplasias malignas pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y de agentes antineoplásicos específicos, que se determinará en base a cada paciente. Las vías de administración incluyen por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis antagonista administrada depende de numerosos factores, incluidos, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración de los antagonistas. No obstante, cabe destacar que la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo o vía de administración concretos.

45 Un experto en la técnica entenderá que las dosis y la frecuencia del tratamiento dependen de la tolerancia de cada paciente individual y de las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas del bloqueo o el agente inhibidor usado. Idealmente se desea alcanzar una farmacocinética saturable para el agente usado. Una dosis de carga para los anticuerpos anti-IGF-IR y anti-PDGFR α puede variar de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 mg/m², preferentemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/m². A esto le pueden seguir varias dosis adicionales diarias o semanales que varían de, por ejemplo, aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/m². Se vigila en el paciente la aparición de efectos secundarios y el tratamiento se detiene cuando dichos efectos secundarios sean graves.

Un experto en la técnica también sabrá cómo vigilar la evolución del tratamiento para determinar una dosis eficaz. Para las metástasis óseas de cáncer de próstata, uno de estos modos es controlar los niveles de PSA. Otros modos de vigilar las metástasis óseas incluyen escáner de huesos y RMN.

55 Para los pacientes para los que la pérdida de hueso inducida por el tratamiento para el cáncer (CTIBL) es un riesgo o un problema (p. ej., pacientes que reciban tratamiento hormonal adyuvante para cáncer de mama o tratamiento con privación de andrógenos para el cáncer de próstata), el tratamiento mencionado anteriormente se puede complementar mediante la administración de agentes para prevenir CTIBL, tal como bisfosfonatos. Los bisfosfonatos

incluyen, por ejemplo, clodronato, risedronato y ácido coledrónico.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo. En numerosas publicaciones, incluidas Sambrook, J y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Coligan, J. y col. (1994) Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated; Enna, S.J. y col. (1991) Current Protocols in Pharmacology, Wiley & Sons, Bonifacino, J.S. y col. (1999) Current Protocols in Cell Biology, Wiley & Sons, se pueden obtener descripciones detalladas de procedimientos convencionales tales como los que se usan en la construcción de vectores y plásmidos, y expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

Ejemplos

10 Ejemplo 1 (ilustrativo)

Efectos de IMC-A12 y docetaxel sobre el crecimiento tumoral

Trozos de tumor (de 20 a 30 mm³) de LuCaP 35V independiente de andrógenos se implantaron por vía subcutánea (s.c.) en 32 ratones SCID de seis semanas de edad, respectivamente como se ha descrito anteriormente (4). Cuando se observó que el tumor implantado había alcanzado de un volumen de 150-200 mm³, se aleatorizó a los animales a cuatro grupos para los estudios de tratamiento. En el grupo 1 los animales recibieron tratamiento con docetaxel a una dosis de 20 mg/kg. En el grupo 2 los animales recibieron tratamiento con docetaxel a una dosis de 10 mg/kg. En el grupo 3 los animales recibieron tratamiento combinado de 10 mg/kg de docetaxel y 40 mg/kg de A 12. En el grupo 4 los animales recibieron tratamiento combinado con 20 mg/kg de docetaxel y 40 mg/kg de A 12. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.). El docetaxel se administró una vez a la semana. El A12 se administró tres veces a la semana. Todos los animales recibieron tratamiento durante cuatro semanas y se les monitorizó durante cuatro semanas adicionales antes del sacrificio. Los tumores se midieron dos veces a la semana y el volumen tumoral se estimó mediante la fórmula: volumen = $L \times W^2/2$. Siguiendo el protocolo de los inventores de la University of Washington IACUC aprobado para animales se sacrificó a algunos animales antes cuando el tumor alcanzó un volumen de 1000 mm³ o cuando la pérdida de peso del animal había superado el 20 % del peso corporal inicial. Se pesó a los animales dos veces a la semana. Las muestras de sangre se extrajeron del seno orbital semanalmente. El suero se separó y se determinó el nivel de PSA usando el ensayo IMx Total PSA Assay (Abott Laboratories, Abott Park, IL). Se inyectó BrdU en los tumores 1 hora antes de sacrificar a los animales para evaluar la velocidad de proliferación de las células tumorales *in vivo*.

Después de sacrificar a los animales se extrajeron los tumores y se partieron por la mitad. Una porción de los tumores se fijó en formalina tampón neutro (NFB) al 10 % y se incluyó en parafina. Se prepararon secciones de cinco micrómetros para tinción por inmunohistoquímica (IHQ). La porción restante de los tumores se separó en células únicas mecánicamente picando y filtrando a través de tamices de nylon de 70 µm.

Como se muestra en la Fig. 1, el xenoinjerto de LuCaP 35V creció de forma agresiva en los ratones a una velocidad de crecimiento promedio de $362,0 \pm 72,0$ mm³/semana sin ningún tratamiento. Se tuvo que sacrificar a todos los animales en el grupo sin tratar en las tres semanas posteriores al inicio del tratamiento en grupos experimentales debido a que el tumor era mayor que 1000 mm³. Cuando los animales fueron tratados con 40 µg/kg de A12 solo, la velocidad del crecimiento tumoral se redujo a $192,7 \pm 35,6$ mm³/semana durante el tratamiento. Cuando se administró docetaxel a los animales a una dosis de 10 mg/kg, velocidad del crecimiento tumoral de LuCaP 35V se redujo a una media de $29,6 \pm 6,1$ mm³/semana. Cuando se administró docetaxel en combinación con tratamiento con A12, la velocidad del crecimiento tumoral de LuCaP 35V se redujo a una media de $7,9 \pm 1,0$ mm³/semana (Fig. 1b). El efecto de inhibición de docetaxel combinado con A12 persistió durante más de cuatro horas después de finalizados los tratamientos. Cuando a los animales se administró una dosis mayor de docetaxel (20 mg/kg) con independencia de con o sin tratamiento combinado con A12, el volumen tumoral no aumentó durante el periodo de tratamiento de cuatro semanas; por el contrario, se observó una tendencia a volúmenes tumorales reducidos. No obstante, en las cuatro semanas posteriores a la finalización del tratamiento, la reducción de los volúmenes tumorales continuó en el grupo de animales tratados con docetaxel combinado con A12. Por el contrario, los volúmenes tumorales aumentaban a una velocidad media de $27,0 \pm 16,1$ mm³/semana en el grupo de animales tratados con docetaxel solo. Estos resultados han sugerido que, en una dosis dada de docetaxel, el tratamiento combinado con A12 puede potenciar el efecto inhibitorio de docetaxel sobre el crecimiento tumoral durante el tratamiento o en los seguimientos posteriores al tratamiento.

El PSA es un parámetro clínico de uso habitual para evaluar el crecimiento del tumor de próstata. Los niveles séricos de PSA se midieron en los animales durante y después de los tratamientos. Como se muestra en la Fig. 1c, en los animales tratados con A12 y docetaxel o 20 mg/kg de docetaxel solo no se observaron cambios significativos en los niveles séricos de PSA durante el tratamiento de cuatro semanas, consistente con el crecimiento tumoral suprimido. Después de finalizado el tratamiento se demostró aumento de los niveles séricos de PSA en los animales tratados con docetaxel solo y, por el contrario, consistente, o incluso menor, en animales tratados con docetaxel en combinación con A12. Estos datos son consistentes con una continua inhibición postratamiento del crecimiento tumoral en animales tratados con docetaxel y A12.

Inducción de apoptosis por docetaxel combinado con anticuerpos anti-IGF-IR

El efecto combinado *in vivo* del tratamiento con docetaxel y A12 sobre el ciclo celular y la supervivencia celular al final del experimento se midió mediante ensayo de marcaje de extremo mellado mediado por desoxinucleotidiltransferasa (TUNEL) y tinción con propidio (PI) usando el kit Apop-Direct (BD BioScience) como se ha descrito anteriormente. Brevemente, 1×10^6 células de la suspensión de célula única se fijaron con 10% de formalina tampón neutro (NBF) seguida de 70% de alcohol etanol a -20°C durante 30 minutos. Después de varios lavados se permeabilizaron las células con 0,1 % de Triton X-100 y se incubaron con dUTP conjugado con FITC y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) a 37°C durante 1 hora, seguido de una incubación con tampón PI/RNasa (100 $\mu\text{g/ml}$ de PI, 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa) a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo usando un aparato BD FACscan. Los datos se analizaron con el software CellQuest^{PRO}.

Cuatro semanas después de terminado el tratamiento se detectó apoptosis en un porcentaje significativo de tumores de animales que se habían tratado con docetaxel (66,7 % en el grupo tratado con 10 mg/kg de docetaxel y 77,8 % en el grupo tratado con 20 mg/kg de docetaxel) en combinación con A12 (Fig. 2b y Tabla 1), con independencia de la dosis de docetaxel que se esté usando. Los acontecimientos apoptóticos medios en estos tumores se produjeron a una velocidad de $15,0 \pm 4,3$ %. No se detectó apoptosis en los animales tratados solo con docetaxel. En su lugar, una mayoría (88 % en el grupo tratado con 10 mg/kg de docetaxel y 100 % en el grupo tratado con 20 mg/kg de docetaxel) de los tumores prosiguió con el ciclo celular normal (Fig. 2a y Tabla 3).

Tabla 3 – Ciclo de las células tumorales y actividades de supervivencia en el momento del sacrificio				
Tratamiento I	Apoptosis (%)	Detención en G1 (%)	Detención en G2 (%)	Ciclo normal (%)
Ninguno	0	0	0	100
Doc (20)	0	0	0	100
Doc (20) + A12	66,7	33,3	0	0
Doc (10)	0	0	12	88
Doc (10) + A12	77,8	0	0	12,2

Para evaluar adicionalmente la capacidad de proliferación de las células tumorales tras diferentes terminaciones de tratamiento, secciones de parafina se tiñeron con anticuerpo anti-BrDU. Las muestras de tumores se fijaron en 10% de NBF, se incluyeron en parafina y se colocaron secciones de 5 μm sobre portaobjetos. Después de desparafinizar y de rehidratar, se recuperaron los antígenos con ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0) a 95°C durante 2 x 5 minutos. Se dejó que los portaobjetos se enfriaran durante 30 minutos, seguido de aclarado secuencial con PBS. La actividad de peroxidasa endógena se inactivó mediante una incubación con 0,3 % de H_2O_2 en metanol durante 15 minutos. Después de bloquear con 1,5 % de suero de cabra normal en PBS que contiene 0,05 % de Tween 20 (PBST) durante 1 hora, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anti-BrDU de ratón (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora, seguida de incubación secuencial con IgG anti-ratón de cabra biotilada durante 30 minutos (Santa Cruz Biotechnology) y diaminobenzidina (DAB) / sustrato cromogénico de peróxido de hidrógeno (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 5-10 min. Todas las etapas de incubación se realizaron a temperatura ambiente. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina (Sigma) y se montaron con permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey). Para control negativo, la IgG de ratón (Vector Laboratories) se usó en lugar del anticuerpo anti-BrDU primario. Los portaobjetos se analizaron con un microscopio Zeiss y se obtuvieron imágenes digitales. El número de núcleos marcados con BrDU y el núcleo total se recogieron de 10 vistas aleatorias de cada sección. El índice de proliferación se calculó mediante el número de núcleos positivos para BrDU dividido por el número total de núcleos. Se contaron diez campos por portaobjetos. La tinción con H y E se realizó usando hematoxilina y eosina (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

En los animales tratados con docetaxel y A12, la captación de BrDU fue significativamente inferior a la de aquéllos tratados con la misma dosis de docetaxel solo (Fig. 3). Estos datos de incorporación de BrDU son consistentes con las observaciones anteriores del ciclo celular y la apoptosis, lo que sugiere que A12 potenciaba significativamente la citotoxicidad de docetaxel.

Regulación diferencial de la expresión génica en tumores tratados con docetaxel combinado con anticuerpo anti-IGF-IR frente a docetaxel solo. Para determinar los posibles mecanismos del efecto potenciado marcadamente de docetaxel por A12 se analizó la expresión de IGF-IR en todos los tumores recogidos mediante inmunohistoquímica y análisis de citometría de flujo. No se observaron diferencias en la expresión en la superficie de

5 IGF-IR entre todos los grupos de tratamiento o en comparación con el grupo control (datos no mostrados). La expresión génica postratamiento se examinó usando análisis de micromatriz de ADNc en tumores de animales que habían recibido 20 mg/kg de docetaxel y 20 mg/kg de docetaxel combinado con A12. En base a los análisis SAM se identificaron 49 genes como se expresan diferencialmente en tumores que habían recibido tratamiento combinado de docetaxel y A12 en comparación con los que habían recibido docetaxel solo, con un cambio de más del doble y una tasa de falsos descubrimientos (TFD) menor del 10% (datos no mostrados). Se identificaron treinta genes que estaban potencialmente implicados en la regulación de la apoptosis o el ciclo celular (Tabla 4). Los 13 genes eran al menos 2 veces diferentes entre los dos tratamientos y tenían una TFD inferior a 0,02%. Nueve genes se regularon por disminución y cuatro se regularon por incremento en tumores tratados con docetaxel y A 12 en comparación con los tumores tratados con docetaxel solo.

10

Tabla 4 – Expresión génica diferencial postratamiento en tumores tratados con docetaxel + A12 en comparación con tumores tratados con docetaxel solo.				
HUGO	Nombre	Función GO	Cambio	TFD
Genes regulados por disminución				
CDC2	Ciclo de división celular 2	Citocinesis, mitosis;	3,0	≤0,02 %
CDC6	Ciclo de división celular CDC6 homólogo 6	Regulación negativa de la proliferación celular	2,2	≤0,02 %
CCNA2	Ciclina A2	Regulación de la actividad CDK	2,1	≤0,02 %
MYBL2	Homólogo del oncogén viral de la mieloblastosis V-myb (aviar) de tipo 2	Anti-apoptosis; desarrollo; regulación del ciclo celular;	3,2	≤0,02 %
TUBB	Polipéptido de la tubulina, beta	Movimiento basado en los microtúbulos, resistencia a taxanos	2,3	≤0,02 %
K-ALPHA-1	Tubulina alfa ubicua	Movimiento basado en los microtúbulos, resistencia a taxanos	2,5	≤0,02 %
BIRC5	Repetición de IAP baculoviral que contiene 5 (survivina)	Anti-apoptosis	2,5	≤0,02 %
CDC25B	Ciclo de división celular 25B	Regulación positiva de la proliferación celular	2,0	≤0,02 %
MYC	Homólogo del oncogén viral de la mielocitomatosis V-myc (aviar)	Detención del ciclo celular;	2,5	≤0,02 %
Genes regulados por aumento				
TOB1	Transductor de ERBB21	Regulación negativa de la proliferación celular	2,2	≤0,02 %
CCNG2	Ciclina G2	Punto de comprobación del ciclo celular	2,1	≤0,02 %
IGFBP3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina	Regulación del crecimiento celular, proapoptótico	2,0	≤0,02 %
BIRC3	Repetición de IAP baculoviral que contiene 3	Anti-apoptosis; transducción de señal unida al receptor de superficie celular	2,2	≤0,02 %

Para determinados genes, los resultados se confirmaron mediante PCR-RT en tiempo real. Se purificó un fragmento de PCR estándar de un ADNc diana. Se usó una serie de diluciones de los patrones desde 10 ng/μl a 10⁻³ pg/μl para la PCR-RT en tiempo real con el fin de generar curvas estándar. Un μg del ARN total de cada grupo de tumores combinados se usó para la síntesis de ADN de la primera hebra usando el sistema Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen). La PCR-RT en tiempo real se realizó en 20 μl de la mezcla de reacción que contiene 1 μl de la primera hebra de ADNc, conjuntos de cebadores específicos y Lightcycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green usando un Roche Lightcycler siguiendo el protocolo del fabricante (Roche, Nutley, NJ). Los productos de la PCR-RT se sometieron a análisis de la curva de fusión usando software Lightcycler v3.5. Los tamaños del amplicón se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Cada muestra se analizó por duplicado. Los resultados se muestran en la figura 4.

De los genes regulados por disminución, se ha demostrado que TUBB tiene como resultado resistencia al docetaxel (Tanaka y col., 2004, Int. J. Cancer 111, 617-26), y se ha mostrado que el incremento de la expresión de BIRC 5 (survivena) está asociado con cáncer de próstata agresivo y resistencia a la terapia antiandrógenos (de Angelis y col., 2004, Int. J. Oncol. 24, 1279-88; Zhang y col., 2005, Oncogene 24, 2474-82). Además, TUBB es un gen regulado por IGF-IR que está implicado en la transformación mediada por IGF-IR (Loughran y col., 2005, Oncogene 24, 6185-93). De los cuatro genes regulados por aumento, se ha demostrado que IGFBP3 inhibe la señalización del ligando-IGF así como induce apoptosis en células de tumor de próstata de un modo dependiente de ligando (Grimberg y col., 2000, J. Cell. Physiol. 183, 1-9).

Niveles séricos postratamiento de A12.

Los niveles séricos de A12 se midieron en animales que habían recibido docetaxel combinado con A12. Los niveles séricos de A12 disminuyeron 100 veces dos semanas después de finalizado el tratamiento y se detectó a un nivel muy bajo cuatro semanas después de finalizado el tratamiento (Fig. 5).

Citotoxicidad global.

Se investigó la citotoxicidad de la coadministración de docetaxel y IMC-A12. Aunque A12 tenía una reactividad cruzada superior al 95% con IGF-IR murino, no se observaron actividad diaria anormal ni cambios en el comportamiento de animales tratados con reactivos combinados o con docetaxel solo en comparación con los animales portadores de tumores. No se observaron efectos significativos sobre las células renales en ningún grupo de tratamiento mediante ensayos del ciclo celular y de apoptosis (datos no mostrados). No se observaron cambios significativos en el peso corporal entre los grupos de tratamiento (Fig. 6).

Tratamiento con anticuerpos anti-IGF-IR para metástasis óseas.

La eficacia del tratamiento con anticuerpos anti-IGF-IR sobre el crecimiento metastásico de las células de cáncer de próstata en hueso se evaluó usando células de cáncer de próstata inyectadas directamente en la tibia de ratones SCID. Mediante este procedimiento, los tumores metastásicos se establecieron directamente sin dependencia de la invasión dependiente de quimiotaxis desde la circulación. Se dispone de varias líneas tumorales para establecer metástasis óseas. Estas incluyen células PC-3, LuCaP35 y LnCaP que producen lesiones osteolíticas y células LuCaP 23.1, que producen lesiones osteoblásticas.

Las células LuCaP 23.1, que expresan IGF-IR, tienen una tasa de captación de ~80 % en el entorno óseo y dan como resultado reacciones osteoblásticas. En experimentos preliminares, las muestras de LuCaP 23.1 exhibieron un incremento significativo del volumen óseo frente al volumen tisular (% VO/VT) en tibias con tumor frente a control (254-503 % del control, p=0,024). Todos los tumores LuCaP 23.1 en las tibias exhibieron nuevas trabéculas óseas que no estaban presentes en las muestras normales y un número elevado de focos tumorales que habían sustituido a la médula ósea normal. En algunas muestras, el crecimiento del tumor y del hueso se extendieron hacia fuera del hueso original. El incremento del % VO/VT de las muestras de LuCaP 23.1 también se observó tras la castración; el % VO/VT de las tibias tumorales fue de 212-354 % de las tibias no tumorales (p=0,024). Los resultados observados para los xenoinjertos intratibiales de LuCaP 23.1 son indicativos de formación de hueso de novo estimulada por células tumorales. Además, los tumores muestran muchas similitudes con las muestras humanas de metástasis óseas osteoblásticas, incluyendo un gran número de focos tumorales y cantidades mayores de hueso mineralizado.

Para evaluar la eficacia del tratamiento con IMC-A12, tumores de xenoinjerto de LuCaP 23.1 se injertaron en ratones SCID y se midieron los niveles de PSA en suero dos veces a la semana para evaluar el crecimiento del tumor. Se castró a todos los animales dos semanas antes del injerto de las células tumorales tibiales. La administración de IMC-A12 para analizar los ratones se comenzó cuando los niveles séricos de PSA alcanzaron 5-10 ng/ml (lo que indica tumores establecidos). Se inyectaron 40 mg/ml de IMC-A12 i.p. tres veces a la semana durante seis semanas.

Se midió la densidad mineral ósea (DMO) de las tibias tumoradas y las tibias contralaterales sin tumor mediante absorciometría doble de rayos x (densitómetro PIXImus Lunar) en un área de 2,5 mm x 2,5 mm en el punto de inyección de la célula tumoral o el sitio correspondiente de la tibia contralateral en el momento del injerto. La evaluación dos veces a la semana de las lesiones se realizó mediante determinaciones de PSA en suero. Se sacrificó a todos los animales cuando las lesiones óseas en el grupo control habían ocurrido tras la castración en base a los niveles séricos de PSA (LuCaP 35 >60 ng/ml, ng/ml, LuCaP 23.1 >500 ng/ml), el aspecto radiográfico de

las lesiones óseas o cuando los animales estaban comprometidos. Una hora antes del sacrificio de los animales se inyectó BrdU para seguir la proliferación de células tumorales. Se realizaron radiografías antes del sacrificio (FaxitronX-ray MX-20) y la DMO de ambas tibias se midió en el momento del sacrificio.

Tabla 5. Densidad mineral ósea (DMO)				
Tratamiento	A12		Control	
	Pierna tumorada	Pierna no tumorada	Pierna tumorada	Pierna no tumorada
Media	0,060	0,045	0,098	0,053
Valor P en comparación con el tumor control	0,0057			
Valor P en comparación con la pierna no tumorada	0,0004		0,0049	

5 Los niveles de PSA en suero fueron significativamente menores en los ratones tratados con IMC-A12 (Fig. 7) y el incremento de la DMO asociado con el crecimiento de tumores metastásicos osteoblásticos también se redujo significativamente (Tabla 5). Las mediciones de la DMO de las piernas no tumoradas indicaron que el tratamiento de IMC-A12 no produjo una pérdida de densidad ósea (osteoporosis). Las radiografías de ratones tratados con IMC-A12 y sin tratar muestran que la progresión tumoral se reducía significativamente o se evitaba en ratones tratados (Fig. 8).

Combinación de anticuerpos anti-IGF-IR y docetaxel para metástasis óseas.

15 Se castró a ratones SCID 2 semanas antes de inyectarles tumores tibiales. Las metástasis óseas se generan mediante inyección directa de células de cáncer de próstata LuCaP 23.1 en las tibias de los ratones que dan lugar a lesiones osteoblásticas. Los xenoinjertos expresan IGF-IR. Los niveles de PSA en suero se miden dos veces a la semana para evaluar el crecimiento tumoral. Cuando los niveles de PSA en suero alcanzan los -10 ng/ml indicativos de tumor establecido, se aleatorizó a los animales a cuatro grupos.

20 En dos grupos, se inyectan 40 mg/kg de IMC-A12 i.p. tres veces a la semana durante seis semanas, un grupo recibió IMC-A12 + docetaxel a 20 mg/kg i.p. una vez a la semana durante 6 semanas y un segundo grupo recibió IMC-A12 + docetaxel a 10 mg i.p. tres veces a la semana durante seis semanas. Los grupos control reciben de 10 a 20 mg de docetaxel i.p. sin IMC-A12.

25 Los animales se vigilaron con mediciones semanales de PSA. Después de finalizado el tratamiento se continúa vigilando a los animales con mediciones semanales de PSA hasta que los tumores de los grupos tratados solo con docetaxel muestran recrecimiento. A medida que los valores de PSA aumentan en los grupos tratados solo con docetaxel (aunque a una velocidad menor que en los animales sin tratar), los niveles de PSA en los ratones tratados con IMC-A12 + docetaxel se equilibran y, en algunos animales, empiezan a disminuir. Se observa que las reducciones de los niveles de PSA continúan, incluso después de finalizado el tratamiento a las seis semanas.

Como se ha indicado anteriormente, se realizan mediciones de la DMO en el momento del injerto y en el sacrificio, y se realizan radiografías justo antes del sacrificio. Los grupos tratados con IMC-A12 + docetaxel muestran poco o ningún incremento de la DMO y las radiografías muestran poco o ningún signo de actividad osteoblástica.

Combinación de anticuerpos anti-IGF-IR y docetaxel para metástasis óseas.

35 Mecánicamente se digirieron pedazos de tumor de próstata humano LuCaP 23.1 (de 20 a 30 mm³). Se inyectaron 2-5 x 10⁵ células LuCaP 23.1 viables en las tibias de ratones SCID de 6-8 semanas de edad. Para el estudio se usaron 21 ratones distribuidos aleatoriamente en tres grupos. Tras la inyección del tumor, los niveles en suero de PSA se vigilaron semanalmente. El tratamiento comenzó cuando el nivel en suero de PSA alcanzó 5-10 ng/ml, una indicación de crecimiento tumoral. El grupo 1 recibió tampón de solución salina como vehículo control. El grupo 2 recibió 20 mg/kg de docetaxel i.p. una vez a la semana durante 4 semanas. El grupo 3 recibió 20 mg/kg de docetaxel una vez a la semana y 40 mg/kg de A12 i.p. tres veces a la semana durante 4 semanas. Para determinar si la respuesta al tratamiento era osteoblástica u osteolítica se midió la DMO mediante Dexa-scan y rayos x de los animales al final de todos los tratamientos.

40 El docetaxel solo o docetaxel combinado con A 12 inhibieron significativamente el crecimiento de tumores LuCaP 23.1 como refleja la supresión de los niveles de PSA en suero (Fig. 9a), sin una diferencia significativa entre los dos

tratamientos. No obstante, después de finalizado el tratamiento, los niveles séricos de PSA comenzaron a aumentar en los animales tratados con docetaxel solo, lo que indica recrecimiento del tumor, mientras que se observó continuación de la supresión de niveles séricos de PSA en los animales que recibieron tratamiento combinado, lo que indica un periodo prolongado de inactividad tumoral postratamiento. Se demostró que los niveles séricos de PSA se correlacionaban con la densidad mineral ósea (DMO) y se realizaron radiografías de los tamaños de los huesos tumorados (Fig. 9b). A la quinta semana, la densidad mineral ósea media en el control, y en los animales tratados con docetaxel 20, y con docetaxel 20 combinado con A12 fue $0,112 \pm 0,01$, $0,09 \pm 0,02$, y $0,05 \pm 0,009$ (media \pm SEM), respectivamente. Se produjo una tendencia evidente hacia una disminución de la densidad ósea con el tratamiento.

10 Ejemplo 2

Fosforilación de Akt inducida por aspirado de médula ósea

Las muestras de médula ósea de donantes varones normales (de 18-45 años de edad) fueron suministradas por Cambrex (Poietics™ Donor Program). Las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm con el fin de separar las fases soluble y celular. El sobrenadante se filtró usando filtros de $0,8 \mu\text{m}$ y $0,22 \mu\text{m}$ en sucesión. Se administraron $50 \mu\text{l}$ de aspirado de médula ósea a las células en 1 ml de medio (dilución final de 1:20).

Para los experimentos realizados en presencia de suero se cultivaron las células en DMEM suplementado con 10 % de FBS y $50 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina durante 24 horas antes de la exposición a la médula ósea. Para los experimentos en ausencia de suero (células hambrientas), las células se lavaron dos veces con PBS, el medio de crecimiento se sustituyó con DMEM sin suero y las células se incubaron durante 4 horas antes de la exposición a las preparaciones de médula ósea. Cuando se usa AG-1296, un inhibidor específico de los receptores de PDGF (Rice y col., 1999, Amer. J. Path. 155, 213-21) se añade a los cultivos 30 minutos antes de la exposición al aspirado de médula ósea. Los anticuerpos IMC-3G3 se administraron como se describe en los tiempos pretratamiento como se indica más adelante.

La activación de Akt por la médula ósea se detectó en células in PC3-ML, que expresan PDGFR α , pero no en las células DU-145, que carecen del receptor. En un experimento, para minimizar el efecto de los componentes séricos sobre la activación de Akt, las células se preincubaron durante 4 horas en medio sin suero. La adición de extractos de médula ósea tuvo como resultado una sólida fosforilación de Akt en células PC3-ML, pero no en células DU-145. (Fig. 10A). Para evaluar el significado de la respuesta se realizó un segundo experimento con suero. La sólida estimulación de la fosforilación de Akt en células PC3-ML por el aspirado de médula ósea también se observó en presencia de suero. (Fig. 10B). Se produjo una pequeña respuesta en las células DU-145.

Fosforilación de Akt mediada por PDGFR α

Se piensa que los osteoblastos y los osteoclastos, que secretan PDGF-AA y PDGF-BB, proporcionan estos factores de crecimiento en el medio soluble de la médula ósea. Para determinar si la capacidad de respuesta de las células PC3-ML a los extractos de médula ósea estaba relacionada con la transducción de señal a través de PDGFR α , se expuso a las células PC3-ML a aspirado de médula ósea en ausencia o presencia de AG-1296 $20 \mu\text{M}$. La concentración de AG-1296 inhibe completamente la activación de Akt inducida por PDGF-BB. (Fig. 11A) AG-1296 inhibió la activación de Akt inducida por el aspirado de médula ósea en más de un 40 %. (Fig. 11B y D). Esto indica que la señalización de PDGFR α es responsable de una proporción significativa de activación de Akt inducida por médula ósea.

También se evaluó la contribución directa de PDGF-AA y -BB a la señalización de PDGFR α respecto a otros componentes de los aspirados de médula ósea. Se determinó que las concentraciones de PDGF-AA y -BB en aspirados de médula ósea de tres donantes diferentes variaban de 400 pg/ml o a 2 ng/ml . Dada la dilución por 20 de los aspirados de médula ósea, las células de ensayo se estaban exponiendo realmente a concentraciones de PDGF-AA and -BB entre 20 y 100 pg/ml . De acuerdo con esto, las células PC3-ML fueron tratadas con 100 pg/ml cada una de PDGF-AA y -BB. La fosforilación de Akt fue menor al 10% de la obtenida con los aspirados de médula ósea. Fig. 3C y D). De acuerdo con esto, parece que la activación de la vía de Akt mediante la señalización de PDGFR α puede implicar a ligandos de PDGFR α distintos de PDGF-AA y -BB y/o mecanismos que no son la activación de PDGFR α mediante unión directa de un ligando.

Inhibición de la fosforilación de Akt por un anticuerpo anti-PDGFR α

También se investigó la capacidad del anticuerpo neutralizante IMC-3G3, que es específico del PDGFR α humano, para inhibir la fosforilación de Akt en células PC3-ML. Un tiempo de preincubación de 30 minutos y una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$ neutralizaron el efecto estimulante de 30 ng/ml de PDGF-BB. (Fig. 12A) El tratamiento con el anticuerpo también dio como resultado una inhibición de aproximadamente un 40% de la fosforilación de Akt inducida por la médula ósea (Fig. 12B y C). También se observó que el efecto inhibitorio de IMC-3G3 sobre la fosforilación de Akt era dependiente de la duración de la preincubación, siendo un tiempo de incubación de 120 minutos significativamente más eficaz (Fig. 12D) que el tiempo de incubación de 30 minutos (Fig. 12B y C). Una posible explicación es que IMC-3G3 induce neutralización de PDGFR α y que su efecto inhibitorio está relacionado no solo con el bloqueo de la unión al ligando sino también con la eliminación del receptor de la membrana plasmática.

Ejemplo 3**Aislamiento de anticuerpos anti-PDGFR α humanos**

Se generaron anticuerpos monoclonales anti-PDGFR α humanos mediante tecnología de hibridoma estándar (Harlow & Lane, ed., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que se incorpora en el presente documento por referencia) usando ratones transgénicos (Medarex Inc., Sunnyvale, CA) que expresan las cadenas de inmunoglobulina ligera kappa y pesada gamma humanas. El dominio extracelular (DEC) de PDGFR α humano se adquirió en &D Systems (Minneapolis, MN). Se inmunizó por vía subcutánea (s.c.) a ratones KM con 3×10^7 de células endoteliales aórticas porcinas que expresan de forma estable PDGFR α (PAE Ra). Tras 4 semanas se realizó un refuerzo s.c. en los ratones con 50 μ g del DEC de PDGFR α en adyuvante completo de Freund más 3×10^7 células PAE Ra administradas i.p. Los ratones recibieron refuerzos dos veces más, separadas por 3 semanas, con 25 μ g del DEC de PDGFR α de adyuvante incompleto de Freund.

Se aislaron esplenocitos de ratones con títulos elevados de proteínas de unión y bloqueantes en suero y se fusionaron con células de mieloma. Los cultivos de hibridoma que muestran actividad bloqueante se subclonaron y los anticuerpos de estos hibridomas se purificaron mediante cromatografía de proteína G.

Las IgG se evaluaron para determinar la unión a PDGFR α en un ensayo de unión directo. Se inmovilizó el DEC de PDGFR α en PBS en una placa de 96 pocillos (100 ng/pocillo). Después se lavaron las placas con PBST (PBS + 0,05 % Tween 20) y se bloquearon con PBSM (3 % de leche en PBS, 200 μ l/pocillo) durante dos horas a 25° C. Las IgG diluidas en PBSM se incubaron con el DEC del PDGFR α inmovilizado durante 1 hora a 25° C y las placas se lavaron con PBST. Un anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa de rábano-F(ab')₂ de IgG antihumano de cabra; BioSource International, Camarillo, CA) diluido a 1:5-000 en PBSM se añadió durante 1 hora a 25° C. Después de lavar las placas con OBST se añadió un sustrato de TMB peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD) y la reacción se detuvo con 100 μ L de H₂SO₄, 1 mol/l. Las placas se leyeron a A450 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

El bloqueo de PDGF se evaluó usando un ensayo de bloqueo de PDGF de fase sólida (Véase, Duan y col., 1991, J. Biol. Chem. 266:413-8). El DEC de PDGFR α se diluyó en PBS y se revistió en placas de microtitulación de 96 pocillos (Immulon 2HB de fondo plano 1 x 12 tiras extraíbles de poliestireno de unión a proteínas; Dynex Technologies, Chantilly, VA). Cada pocillo se revistió con 60 ng de PDGFR α durante 3 horas a 25° C en un volumen total de 100 μ l. Después se lavaron las placas dos veces y se bloquearon durante la noche a 4° C con HEPES 25 mmol/l (pH 7,45), 0,5 % de gelatina, NaCl 100 mmol/l y 0,1 % de Tween 20. Después se calentaron las placas hasta 25° C durante 20 minutos y se lavaron una vez con tampón de unión (HEPES 25 mmol/l (pH 7,45), 0,3 % gelatin, 100 mmol/L NaCl, 0,01 % Tween 20). Se añadieron cincuenta microlitros a cada pocillo y se incubaron a 25° C durante 30 minutos. El PDGF yodado se diluyó en tampón de unión y se añadió a cada pocillo (50 μ l de una solución 1 nmol/l). Las placas se incubaron durante 2 horas a 25° C y después se lavaron cinco veces con tampón de unión. Cada pocillo se contó en un contador gamma. Se realizó un ensayo de bloqueo celular como se describe en Heldin y col., 1988, EMBO J. 7, 1387-93.

La cinética de la unión del anticuerpo a PDGFR α se midió usando un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El DEC de PDGFR α se inmovilizó sobre un circuito sensor y el anticuerpo se inyectó a varias concentraciones. Los sensogramas se obtuvieron a cada concentración y se evaluaron mediante BIA Evaluation 2.0, un programa para determinar las constantes de velocidad. La constante de afinidad K_d se calculó a partir de la relación de las constantes de velocidad k_{on}/k_{off}.

La Fig. 13 muestra la unión dependiente de la dosis del anticuerpo monoclonal humano IMC-3G3 al DEC del PDGFR α en ELISA inmovilizado. La concentración del anticuerpo requerida para una unión máxima del 505 al DEC del PDGFR α fue de 0,06 nmol/l (Tabla 6). La DE₅₀ es consistente con la K_d del anticuerpo, según determina la resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore (Tabla 1). El anticuerpo monoclonal también bloqueó la unión de [¹²⁵I]PDGF-BB al receptor inmovilizado, con una CI₅₀ de 0,43 nmol/l. Los sitios de unión para PDGF-AA y PDGF-BB en PDGFR α no coinciden estructuralmente., Los datos sugieren que el epítopo para 3G3 solapa espacialmente los sitios de unión de ambos factores de crecimiento.

Tabla 6 Características de unión del anticuerpo anti-PDGFR α

Unión a PDGFR α	Bloqueo de PDGF		Cinética de unión		
	Fase sólida (CI ₅₀ , nmol/l)	Celular (CI ₅₀ , nmol/l)	K _{on} (10 ⁵ mol/l ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	K _d (10 ⁻⁹ mol/l)
(DE ₅₀ , nmol/l)	0,06	0,58	11,50	0,47	0,04

Inhibición de la fosforilación del receptor y activación de las moléculas efectoras cadena abajo

Los efectos de la señalización intracelular inducida por PDGF por IMC-3G3 se determinó usando células PAE R α . Las células se sembraron en seis placas de cultivo tisular Falcon (250.000 células/pocillo) y se dejaron crecer durante la noche. Después se aclararon los pocillos y se incubaron en medio sin suero. Después de una incubación durante la noche para llevar las células a latencia, se trató a las células con anticuerpos durante 30 minutos a 37°C, seguido de la adición de PDGF-AA o PDGF-BB y la incubación durante 10 minutos adicionales a 37 °C. Después, las células se desprendieron y lisaron en 200 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mmol/l (pH 8,0), 1 % de Triton X-100, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA, 0,1% de SDS, 1 mmol/l de ortovanadato sódico e inhibidores de la proteasa (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania)) Los lisados celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western usando reactivos de quimioluminiscencia potenciada e Hyperfilm (Amersham Biosciences).

El anticuerpo se analizó para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación de la tirosina receptora inducida por ligando. PDGF-AA y PDGF-BB aumentan la fosforilación de la tirosina del PDGFR α aproximadamente 5 veces a concentraciones de 1 y 3 nmol/l, respectivamente. Concentraciones más altas de ligando (10 nmol/l) dieron como resultado menos fosforilación de los receptores, posiblemente a causa de la degradación inducida por ligando. El anticuerpo inhibió el receptor inducido por PDGF-BB a niveles casi basales (Fig. 14A, fila superior). Se obtuvieron datos similares usando PDGF-AA para inducir fosforilación del receptor.

Los PDGF translucen las señales mitogénicas y ejercen efectos antiapoptóticos sobre las células que expresan el receptor mediante proteínas efectoras corriente abajo. De acuerdo con esto, se analizó la capacidad del anticuerpo monoclonal para inhibir la activación de las MAPK p44/p42 y Akt (implicadas en el crecimiento celular y las vías antiapoptóticas, respectivamente). El anticuerpo anti-PDGFR α inhibió la fosforilación de MAPK y AKT en respuesta al PDGF-BB (Fig. 2A) y PDGF-AA (no mostrado). La inhibición de la fosforilación de PDGFR α era dependiente de la dosis, consiguiéndose una inhibición del 50% a 0,25 nmol/l (Fig. 14B).

Actividad antimitogénica

Se analizó la capacidad del anticuerpo monoclonal anti-PDGFR α para bloquear la mitogénesis inducida por PDGF-AA de las células PAE R α . Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (1 x 10⁴ células/pocillo) y se cultivaron durante la noche en 100 μ l de medio por pocillo. Después, los pocillos se aclararon con medio sin suero y las células se dejaron sin suero durante la noche añadiendo 75 μ l de medio sin suero a cada pocillo. Se añadió iGg ζ (25 μ l/pocillo) y las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Después se añadió PDGF-AA o PDGF-BB (25 μ l/pocillo) y las placas se incubaron durante de 18 a 20 horas a 37 °C. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales después de que cada pocillo recibiera 0,25 μ Ci de [³H]timidina (25 μ l/pocillo). El anticuerpo, PDGF y la timidina [³H] se diluyeron en medio sin suero. Después, las células se lavaron con PBS más 1% de seroalbúmina bovina y se desprendieron mediante tratamiento con tripsina (100 μ l/pocillo). Las células se recogieron en un filtro y se lavaron tres veces con agua bidestilada usando un cosechador celular MACH III (Tomtec, Inc., Hamden, CT). Después de procesar el filtro, el ADN con radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo (Wallac Microbeta, modelo 1450).

Cuando se añadió IMC-3G3 a células PAE R α sin suero, la incorporación de timidina inducida por PDGF-AA se inhibió específicamente (Fig. 15) con una CE₅₀ de 8,3 nmol/l. El anticuerpo también inhibió la mitogénesis inducida por 3 nmol/l de PDGF-BB de las células PAE R α con una CE₅₀ de 1,25 nmol/l (datos no mostrados).

Inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales humanas que expresan PDGFR α .

Se analizaron líneas de células tumorales humanas que expresan PDGFR α para determinar los efectos del anticuerpo anti-PDGFR α humano sobre el crecimiento maligno en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Dichas líneas de células tumorales que expresan PDGFR α determinado mediante citometría de flujo son SKLMS-1 (leiomiocarcinoma) y U118 (glioblastoma). Estas líneas celulares también responden al ligando en ensayos mitogénicos y forman tumores en ratones. SKLMS-1 tiene el potencial de estimulación no solo paracrina sino también autocrina. Se demostró que SKLMS-1 expresaba la proteína PDGF-AA cuando creció en cultivo usando una técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo de tipo sándwich (R&D Systems).

Como se puede ver en la Fig. 16A, IMC-3G3 inhibió la fosforilación de Akt y MAPK en respuesta a la estimulación con PDGF-AA de las células SKLMS-1. La inhibición de la fosforilación de Akt fue del 100% y la de MPK fue de aproximadamente el 80%. El anticuerpo también es un inhibidor eficaz de la fosforilación en células U118 (Fig. 16B). La mitogénesis inducida por ligando de las células tumorales también se bloqueó. Cuando se añadió el anticuerpo anti-PDGFR α a células U118 sin suero, la incorporación de timidina inducida por PDGF-AA se inhibió específicamente (Fig. 17A) con una CE₅₀ de 3,4 nmol/l. El anticuerpo también inhibió la respuesta mitogénica inducida por PDGF-AA de células SKLMS-1 con una CE₅₀ de 5 nmol/l (Fig. 17B), así como la respuesta mitogénica estimulada por PDGF-BB (Fig. 17C). Para las células U118 solo se observó una inhibición parcial (40% a 66 nmol/l; Fig. 17D) de la respuesta mitogénica estimulada por PDGF-BB. Esto se atribuye a la expresión de PDGFR α y PDGFR β en dichas células (datos no mostrados).

Inhibición del crecimiento de xenoinjertos tumorales

Se analizó IMC-3G3 *in vivo* en modelos de xenoinjerto subcutáneo (s.c.) de glioblastoma (U118) y leiomiomasarcoma (SKLMS-1) en ratones atímicos. Los xenoinjertos tumorales s.c. se establecieron inyectando 10×10^6 de células SKLMS-1 o U118 mezcladas en Matrigel (Collaborative Research Biochemicals, Bedford, MA) en ratones atímicos hembra (Cri:NU/NU-nuBR, Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Se dejó que los tumores alcanzaran un volumen tumoral medio ($\pi/6 \times$ mayor longitud \times anchura perpendicular²) de aproximadamente 400 mm³. Se aleatorizó a los ratones a cinco grupos (n= 12) y se trató mediante inyección i.p. dos veces a la semana durante el estudio. Los ratones del grupo 1 fueron tratados con control vehículo (NaCl al 0,9 %, USP for Irrigation, B/Braun). Los ratones de los grupos 2 a 4 fueron tratados con 6, 20 y 60 mg/kg del presente anticuerpo anti-PDGFR α . Los ratones del grupo 5 se trataron con 60 mg/kg de IgG humana (Sigma). Los grupos tratados con 6, 20, o 60 mg/kg del anticuerpo anti-PDGFR α o la IgG humana recibieron dosis de carga de 21,4, 71,4, y 214 mg/kg, respectivamente. Las dosis de carga se calcularon para alcanzar una concentración plasmática constante desde la primera dosis (semivida de eliminación, 7 días) usando una pauta de dosificación de dos veces a la semana. Los volúmenes tumorales se evaluaron dos veces a la semana y el crecimiento tumoral en los grupos de tratamiento se comparó con medidas ANOVA repetidas.

Como se muestra en la Fig. 18A, la IgG humana no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del glioblastoma en comparación con los ratones tratados con solución salina (P = 0,74), mientras que el anticuerpo anti-PDGFR α inhibió significativamente el crecimiento del tumor a dosis de 6 (P = 0,06), 20 (P = 0,03) y 60 (P = 0,0004) mg/kg. Al final del estudio con U118, los valores de % T/C [(volumen tumoral promedio del grupo tratado con 3G3 al final del estudio / volumen tumoral promedio al principio del tratamiento) / (volumen tumoral promedio del grupo tratado con control al final del estudio / volumen tumoral promedio al principio del tratamiento) \times 100] fueron 67 %, 63 %, y 35 % para los grupos tratados con las dosis de 6, 20 y 60 mg/kg de 3G3, respectivamente. Además se observó regresión tumoral en 4 de 12, 5 de 11 y 10 de 12 animales en los grupos de tratamiento con 6, 20, y 60 mg/kg. No se observaron regresiones en ningún grupo control.

La Fig. 18B muestra que el crecimiento del leiomiomasarcoma también se inhibió significativamente mediante el tratamiento con 6 (P = 0,02), 20 (P = 0,003), y 60 (P < 0,0001) mg/kg. Los valores de % T/C finales fueron 66 %, 57 %, y 31 % para los grupos de tratamiento con 6, 20, y 60 mg/kg respectivamente, sin regresiones tumorales.

El análisis histológico de los xenoinjertos al final del tratamiento mostró marcadas diferencias en los tumores de animales tratados en comparación con los tumores de animales tratados con terapia control. Los tumores reseccionados se fijaron en agente de fijación QDL a 4 °C durante 24 horas. Después de incluir en parafina y realizar secciones de 4 μ m, secciones fijadas en formalina se tiñeron con H y E de Mayer (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

En el grupo de U118 tratado con la dosis más alta (60 mg/kg) se encontraron menos células viables y había significativamente más regiones con pocas células en comparación con el grupo control tratado con solución salina (Fig. 18C). Los xenoinjertos de SKLMS-1 tratados también mostraron el día 25 una reducción de la cantidad de células tumorales viables y de empaquetamiento celular en comparación con el control tratado con solución salina (Fig. 18D).

Inhibición *in vitro* de la estimulación mediada por PDGFR α de una línea de glioblastoma.

El nivel de fosfotirosina receptora en los tumores U118 se evaluó una semana después del tratamiento con el anticuerpo anti-PDGFR α de IgG humana. Los ratones con tumores U118 establecidos (500 mm³) recibieron tratamiento con 214 mg/kg de dosis de carga, seguido 72 horas después por una dosis de mantenimiento de 60 mg/kg del anticuerpo. Los tumores se extrajeron de los ratones una semana (168 horas) después de la primera inyección del anticuerpo (antes de observar regresión del tumor de media; véase la Fig. 18A) y se homogeneizaron en tampón de lisis del ensayo de fosforilación (véase en lo que antecede). Los lisados se centrifugaron dos veces a 14.000 rpm y se determinó la concentración de proteínas para el sobrenadante recogido (ensayo de proteínas Bio-Rad, BIO-RAD, Hercules, CA). El lisado (4 mg) de cada muestra se inmunoprecipitó usando el anticuerpo anti-PDGFR α . El PDGFR α humano inmunoprecipitado se inmunotransfirió después con un anticuerpo anti-PDGFR o anti-fosfotirosina. La Fig. 19 muestra la administración de anticuerpo anti-PDGFR que tuvo como resultado la reducción del nivel de fosfotirosina de PDGFR α respecto a un control IgG humano en estos tumores.

Ingeniería de la línea celular

Primero, se clonaron y se secuenciaron los genes que codifican los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-PDGFR α . En MEDAREX se obtuvo una serie de cebadores que hibrida con las secuencias flanqueantes en 5' y 3' de las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina humana dentro de los híbridos derivados de MEDAREX. La región variable de cadena pesada se amplificó con el par de cebadores AB88 (directo) y AB90 (inverso) (Tabla 7). Los productos de cadena ligera se amplificaron con los pares de cebadores que contiene el cebador directo AB182 y el cebador inverso AB16 (Tabla 7). Los productos de 0,4 kb de estas reacciones se clonaron en el vector ZeroBlunt (Invitrogen) para producir AB88-1 (V_H) y AB182-3 (V_L) y los insertos se secuenciaron con los cebadores universales T7 y M13R.

Tabla 7 – Cebadores para los hibridomas de MEDAREX			
Oligo	Tamaño	Secuencia del ADN (5'-3')	SEC ID N°
AB88	21	ATGAAACACCTGTGGTTCTTC	20
AB90	21	TGCCAGGGGGAAGACCGATGG	21
AB182	24	ATGGAA (G/A) CCCCAGCGCAGCTTCTC	22
AB16	20	CGGGAAGATGAAGACAGATG	23

Con el fin de generar vectores plasmídicos para expresar todo el anticuerpo IgG1, las regiones variables clonadas se amplificaron mediante PCR y se ligaron en dos etapas en los vectores de expresión que contienen los genes de las regiones constantes. La amplificación de cadena pesada mediante PCR primaria usó 25 ng del plásmido AB88-1 como molde para los cebadores IPHF5 (directo) e IPHR5 (inverso). La amplificación de cadena pesada mediante PCR secundaria usó 5µl de reacción primaria como molde y los cebadores OPSIF e IPHR5. La combinación de los dos cebadores directos añade una secuencia de 57 pares de bases al extremo 5' de los genes de inmunoglobulina que codifican la secuencia señal del gen de cadena pesada de ratón de 19 aminoácidos (MGWSCIIIFLVATATGVHS, SEC ID N° 24), que permite un procesamiento y secreción eficiente de la inmunoglobulina. Además, el cebador directo OPSIF añade una secuencia consenso "Kozak" (J. Mol. Biol. 196:947) para un inicio eficiente de la traducción de estos genes en células de mamífero y un sitio en 5' de endonucleasa de restricción HindIII para clonar el producto amplificado en el vector de expresión adecuado. El cebador inverso de la cadena pesada contiene un sitio NheI dentro del marco para clonar en el vector de la región constante.

La PCR se realizó en dos etapas usando el kit de PCR Expand PCR (Boehringer Mannheim, Inc.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante usando el sistema de tampón Expand n° 3 en reacciones de 50µl con las siguientes condiciones de ciclado.

1 ciclo	94°/2 minutos
5 ciclos	94°, 20 segundos
	48°, 60 segundos
	68°/2 minutos
20 ciclos	94°, 20 segundos
	65°, 60 segundos
	68°/2 minutos
1 ciclo	68°/5 minutos

Después de dos ciclos de PCR, el producto se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se clonó como un fragmento digerido con HindIII-NheI en el vector pDFc (Fig. 8), que contiene la región constante 1 gamma humana.

La amplificación de cadena ligera mediante PCR primaria usó 25 ng del plásmido pAB182-3 como cebadores molde IPLF4 (directo) e IPLR2 (inverso). La amplificación de cadena ligera mediante PCR secundaria usó 5µl de reacción primaria como molde y los cebadores OPSIF e IPLR2. Como para la cadena pesada, los dos cebadores directos proporcionan una secuencia señal de secreción. El cebador inverso de cadena ligera contiene un sitio BsiWI dentro del marco para clonar en el vector de la región constante kappa pLck (Fig. 8). Las reacciones de PCR se realizaron como para la cadena pesada anterior. Después de dos ciclos de PCR, el producto se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se clonó en pLck, que contiene la región constante 1 gamma humana.

Tabla 8. Cebadores para los vectores de expresión de V_H y V_K			
Oligo	Tamaño	Secuencia del ADN (5'-3')	SEC ID N°
OPSIF	53	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGTCATGTATCAT CCTTTTCTAGTAGC	25
IPHF5	58	TCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC	26
IPHR5	37	GCGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTCCCTGG	27
IPLF4	58	TCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA AAATGTGTTGACACAGTC	28
IPLR2	37	GCGCGTACGTTTGATTCCACCTTGGTCCCTGGCCG	29

Con el fin de generar un único vector plasmídico para una transfección estable, el casete de expresión de cadena pesada que contiene el promotor de CMV, la región de codificación de cadena pesada y el elemento poliA se clonaron en el vector de cadena ligera como fragmento NotI-Sall (Fig. 20).

- 5 Después, esta construcción se usó para generar una línea de producción estable en las células NS0 de la línea celular de mieloma. Las células NS0 se transfectaron con el plásmido de expresión mediante electroporación usando el BioRad Gene Pulser II. Antes de la transfección, el ADN del plásmido se linealizó con PvuI, se precipitó en etanol y se resuspendió a una concentración de 0,4mg/ml (40ug en 100 ul de dH₂O). Las células se sometieron a electroporación con los 40 ug de ADN en un volumen final de 800 ul mediante un único pulso de 250 voltios, 400
- 10 μ Fd. Las células electroporadas se dispersaron en alícuotas de 50 ul en medio DMEM (JRH Biosciences Inc.) que contiene 10% de suero bovino fetal dializado (dFCS) (Hyclone, Lote n°: AHA7675) y glutamina 2 mM (Invitrogen/Life Technologies) en pocillos de aproximadamente dieciocho placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 – 10.000 células por pocillo. La selección de los transfectantes positivos para la glutamina sintetasa (GS) se inició 24 horas después mediante la adición de medio DMEM sin glutamina que contiene 10 % de dFCS suplementado con 1 x GS
- 15 (JRH Biosciences, Inc.). Las células se cultivaron durante 2-4 semanas a 37 °C, 5 % de CO₂ para permitir el crecimiento y expansión de las colonias. Se seleccionaron más de 300 colonias usando un ELISA anti-Fc humano (γ) (detección con peroxidasa de rábano a A 450 nm). Los clones que expresaban el anticuerpo (58%) se expandieron y volvieron a analizar para determinar su productividad en un periodo de cultivo de 3-5 días. Para adaptar las células el medio sin suero, las líneas celulares positivas se expandieron mediante la adición de un
- 20 volumen igual de medio de cultivo GS-0S sin suero en cada pase. Las fuertes positivas, que producen 25ug/ml o más en cultivos de 3 días subconfluentes en placas de 24 pocillos se expandieron para su análisis posterior para completar la adaptación al medio sin suero.

Otros aspectos incluyen:

- 25 Un procedimiento de tratar a un sujeto que tiene un tumor óseo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista del IGF-IR.

Un procedimiento de inhibir el crecimiento de un tumor óseo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista del IGF-IR.

Un procedimiento de tratar a un sujeto que tiene un tumor óseo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista del PDGFR α .

- 30 Un procedimiento de inhibir el crecimiento de un tumor óseo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista del PDGFR α

El tumor óseo de acuerdo con estos procedimientos puede ser un tumor primario o secundario.

El crecimiento de las células tumorales puede ser dependiente de andrógenos o independiente de andrógenos.

El tumor puede metastatizar de un cáncer de próstata, un cáncer de mama o un cáncer de pulmón.

- 35 Los antagonistas pueden coadministrarse con un segundo antagonista de la tirosina cinasa receptora.

Los antagonistas pueden coadministrarse con una cantidad eficaz de un agente antineoplásico. El agente antineoplásico puede ser docetaxel, doxorubicina o radiación.

Cuando los procedimientos emplean una cantidad eficaz de un antagonista de IGF-IR:

5 El antagonista de IGF-IR puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede competir por la unión a IGF-IR con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la SEC ID N° 41 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la SEC ID N° 51. Como alternativa, el antagonista de IGF-IR puede ser un inhibidor intracelular de IGF-IR y se puede seleccionar del grupo constituido por AG1024, NVP-AEW541, y BMS-554417.

El antagonista de IGF-IR puede inhibir la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR, neutralizar la activación de IGF-IR por IGF-I o IGF-II, reducir la concentración del receptor de superficie IGF-IR o inhibir la fosforilación de una molécula de señalización corriente debajo del IGF-IR.

10 El antagonista de IGF-IR puede ser un anticuerpo que se une al IGF-IR con una K_d de aproximadamente $3 \times 10^{-10} M^{-1}$ o menor.

El antagonista de IGF-IR puede ser un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico puede ser específico de IGF-IR y PDGFR α ; o IGF-IR y EGFR.

Cuando los procedimientos emplean una cantidad eficaz de un antagonista de PDGFR α :

15 El antagonista puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede competir por la unión a PDGFR α con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la SEC ID 8 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la SEC ID N° 16. Como alternativa, el antagonista de PDGFR α puede ser un inhibidor intracelular de PDGFR α y se puede seleccionar del grupo constituido por AG1296, STI-571 y SU11248.

20 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos usados de acuerdo con estas realizaciones de la invención pueden ser humanos, humanizados o quiméricos.

25 El antagonista de PDGFR α puede inhibir la unión de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas a PDGFR α , neutralizar la activación de PDGFR α , reducir la concentración del receptor de superficie de PDGFR α , inhibir la fosforilación de una molécula de señalización corriente debajo de PDGFR α o inhibir la activación inducida por la médula ósea de Akt.

El antagonista de PDGFR α puede ser un anticuerpo que se une al IGF-IR con una K_d de aproximadamente $10^{-9} M^{-1}$ o menor.

El antagonista de PDGFR α puede ser un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico puede ser específico de PDGFR α y EGFR.

30 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Imclone Systems Incorporated, y col.

<120> Antagonistas de receptor para el tratamiento de cáncer óseo metastásico

35

<130> 11245/54076

<140> pendiente de cesión

<141> 19-06-2006

40

<150> 60/691,920

<151> 17-06-2005

<160> 63

45

<170> PatentIn versión 3,3

<210> 1

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(15)

<400> 1

agc agt agt tac tac
Ser Ser Ser Tyr Tyr
1 5

15

15

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ser Ser Tyr Tyr
1 5

25

<210> 3

<211> 48

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(48).

35

ES 2 435 727 T3

<400> 3

```

  agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac aac ccg tcc ctc agg agt      48
  Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
  1                               5                               10                               15

```

5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

```

  Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
  1                               5                               10                               15

```

15

<210> 5

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(51)

25

<400> 5

```

  cag tcc acg tat tac tat ggt tcg ggg aat tat tat ggc tgg ttc gac      48
  Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp
  1                               5                               10                               15

```

```

  cgc
  Arg

```

30

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

ES 2 435 727 T3

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp
 1 5 10 15

Arg

5

<210> 7

<211> 381

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(381)

15 <400> 7

cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag	48
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc aac agt agt	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser	
20 25 30	
agt tac tac tgg ggc tgg ctc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag	144
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg att ggg agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac aac ccg tcc	192
Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
50 55 60	
ctc agg agt cga ctc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc	240
Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
65 70 75 80	
tcc ctg atg ctg agt tct gtg acc gcc gca gac acg gct gta tat tac	288
Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gcg aga cag tcc acg tat tac tat ggt tcg ggg aat tat tat ggc	336
Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly	
100 105 110	
tgg ttc gac cgc tgg gac cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca	381
Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120 125	

20 <210> 8

<211> 127

<212> PRT

ES 2 435 727 T3

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

5

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(33)

15 <400> 9

agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc 33
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 10

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(21)

<400> 11

gat gca tcc aac agg gcc act
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

21

15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

25 <210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(27)

<400> 13

cag cag cgt agc aac tgg cct ccg gcg
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala
 1 5

27

<210> 14

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

10

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala
 1 5

<210> 15

<211> 321

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

20 <222> (1)..(321)

<400> 15

<p>gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15</p> <p>gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr 20 25 30</p> <p>tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg ctc ctc atc Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45</p> <p>tat gat gca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc agg ttc agt gcc Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 55 60</p> <p>agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 65 70 75 80</p> <p>gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ccg Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro 85 90 95</p> <p>gcg ttc gcc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105</p>	<p>48</p> <p>96</p> <p>144</p> <p>192</p> <p>240</p> <p>288</p> <p>321</p>
--	--

ES 2 435 727 T3

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 16

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

10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Desconocido

15

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 17

20

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 18

<211> 5

25

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido sintético

5 <400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 19

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Desconocido

<220> .

15 <223> Péptido sintético

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

20

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 20 21

30

atgaaacacc tgtggttctt c 21

<210> 21

<211> 21

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 21

5

tgccaggggg aagaccgatg g 21

<210> 22

<211> 24

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador sintético

15

<400> 22

atggaarccc cagcgagct tctc 24

<210> 23

20

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

25

<400> 23

cggaagatg aagacagatg 20

30

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

35

<400> 24

ES 2 435 727 T3

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

Val His Ser

<210> 25

<211> 53

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10

<400> 25

gagaagcttg cgcaccat gggatggta tgtatcatcc ttttctagt agc 53

15 <210> 26

<211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 26

25 tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaca gctgcagctg caggagtc 58

<210> 27

<211> 37

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Sintético

35 <400> 27

cgcgctagct gaggagacgg tgaccagggt tcctgg 37

<210> 28

5 <211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador sintético

<400> 28

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaga aattgtgtg acacagtc 58

15

<210> 29

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 29

25

gcgcgtacgt tgattcca ccttggtccc ttggccg 37

<210> 30

<211> 1431

30 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

35 <222> (1)..(1431)

<400> 30

ES 2 435 727 T3

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gta cat tca cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag	96
Val His Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
aac agt agt agt tac tac tgg ggc tgg ctc cgc cag tcc cca ggg aag	192
Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys	
50 55 60	
ggg ctg gag tgg att ggg agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac	240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr	
65 70 75 80	
aac ccg tcc ctc agg agt cga ctc acc ata tcc gta gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys	

ES 2 435 727 T3

85										90					95					
aac	cag	ttc	tcc	ctg	atg	ctg	agt	tct	gtg	acc	gcc	gca	gac	acg	gct	336				
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Met	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala					
			100					105					110							
gta	tat	tac	tgt	gcg	aga	cag	tcc	acg	tat	tac	tat	ggt	tcg	ggg	aat	384				
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn					
		115					120					125								
tat	tat	ggc	tgg	ttc	gac	cgc	tgg	gac	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	432				
Tyr	Tyr	Gly	Trp	Phe	Asp	Arg	Trp	Asp	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val					
	130					135					140									
tcc	tca	gct	agc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	480				
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser					
					150					155					160					
tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	528				
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys					
				165					170					175						
gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	576				
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu					
			180					185					190							
acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	624				
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu					
		195					200					205								
tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	672				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr					
	210					215					220									
cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	720				
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val					
				230						235					240					
gac	aag	aga	ggt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	768				
Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro					
			245						250					255						
ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	816				
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe					
			260					265					270							
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	864				
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val					
		275					280					285								
aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	912				
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe					
	290					295					300									
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	960				
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro					
	305				310					315					320					
cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	1008				
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr					
			325						330					335						
gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	1056				
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val					
			340					345					350							
tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	1104				
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala					

ES 2 435 727 T3

355	360	365	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			1152
370	375	380	
gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			1200
385	390	395	
400	405	410	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			1248
415	420	425	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			1296
430	435	440	
ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			1344
445	450	455	
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			1392
460	465	470	
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga Tyr Thr Gln Lys Ser Ser Leu Ser Pro Gly Lys			1431
475			

<210> 31

<211> 476

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn
115 120 125

10

ES 2 435 727 T3

Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 245 250 255
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 260 265 270
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 290 295 300
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 385 390 395 400

ES 2 435 727 T3

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 405 410 415
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 435 440 445
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 450 455 460
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 32

<211> 702

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(702)

<400> 32

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15	48
gta cat tca gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu 20 25 30	96
tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val 35 40 45	144
agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg 50 55 60	192
ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg 65 70 75 80	240
ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser 85 90 95	288
cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn 100 105 110	336
tgg cct ccg gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt acg Trp Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr 115 120 125	384
gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu 130 135 140	432

aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro 145 150 155 160	480
aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly 165 170 175	528
aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr 180 185 190	576
agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His 195 200 205	624
aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val 210 215 220	672
aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230	702

<210> 33

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn
100 105 110

Trp Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

10

ES 2 435 727 T3

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 34

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(15)

<400> 34

agc tat gct atc agc
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

15

15

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 35

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

25 <210> 36

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> SAC

<222> (1)..(51)

<400> 36

ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc cag 48
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

10 ggc 51
Gly

<210> 37

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20 Gly

<210> 38

<211> 63

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(63)

30

<400> 38

ES 2 435 727 T3

gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac tac tac 48
 Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

tac tac atg gac gtc 63
 Tyr Tyr Met Asp Val
 20

<210> 39

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

10 Tyr Tyr Met Asp Val
 20

<210> 40

<211> 390

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(390)

20

<400> 40

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 435 727 T3

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc	192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac	336
Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr	
100 105 110	
tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc	384
Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val	
115 120 125	
tca agc	390
Ser Ser	
130	

<210> 41

<211> 130

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

10

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr val Thr val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 42

<211> 1440

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(1440)

<400> 42

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15	48
gta cat tca gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys 20 25 30	96
cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe 35 40 45	144
agc agc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60	192
gag tgg atg gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala 65 70 75 80	240
cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 85 90 95	288
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tat tac tgt gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln 115 120 125	384
gac cac tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr 130 135 140	432
gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu 145 150 155 160	480
gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys 165 170 175	528
ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser 180 185 190	576

ES 2 435 727 T3

ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc 624
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 195 200 205
 tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc 672
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 210 215 220
 ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac 720
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 225 230 235 240
 acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac 768
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 245 250 255
 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc 816
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 260 265 270
 ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 864
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 275 280 285
 cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 912
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 290 295 300
 gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 960
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320
 aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc 1008
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 325 330 335
 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 1056
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 340 345 350
 tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 1104
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 355 360 365
 tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 1152
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380
 cca tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 1200
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400
 gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1248
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415
 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1296
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430
 gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1344
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445
 tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1392
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 450 455 460
 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1440
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 43

5 <211> 479

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln
 115 120 125
 Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
 130 135 140
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 145 150 155 160
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 165 170 175
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 180 185 190
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 195 200 205
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 210 215 220

ES 2 435 727 T3

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 225 230 235 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 245 250 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 44

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(33)

<400> 44

caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca acc
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr
1 5 10

33

5

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 45

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr
1 5 10

15

<210> 46

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(21)

<400> 46

25

ggt gaa aat aag cgg ccc tca
Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

21

<210> 47

<211> 7

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 48

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(33)

<400> 48

aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat ctg gtg
Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val
1 5 10

33

15

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 49

Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val
1 5 10

<210> 50

25 <211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30 <221> SAC

<222> (1)..(327)

<400> 50

ES 2 435 727 T3

tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag 48
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca 96
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

acc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct att ctt gtc atc tat 144
 Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

ggt gaa aat aag cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc 192
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gca gaa 240
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

gat gag gct gac tac tat tgt aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
 85 90 95

ctg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt 327
 Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 51

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

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

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
 85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 52

<211> 702

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(702)

5

<400> 52

```

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga      48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

gta cat tca tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc      96
Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
20 25 30

ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc      144
Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
35 40 45

tat tat gca acc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct att ctt      192
Tyr Tyr Ala Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu
50 55 60

gtc atc tat ggt gaa aat aag cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc      240
Val Ile Tyr Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
65 70 75 80

tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct      288
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
85 90 95

cag gca gaa gat gag gct gac tac tat tgt aaa tct cgg gat ggc agt      336
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser
100 105 110

ggt caa cat ctg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt      384
Gly Gln His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
115 120 125

cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag      432
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc      480
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc gtc      528
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
165 170 175

aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag      576
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc      624
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag      672
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct tga      702
Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
225 230

```

10

<210> 53

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

5

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

<210> 54

10 <211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(33)

5

<400> 54

caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

33

10 <210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 55

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 56

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> SAC

<222> (1)..(21)

<400> 56

ggc aaa aac aac cgg ccc tca
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

21

30

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

ES 2 435 727 T3

<213> Homo sapiens

<400> 57

5 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 58

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

<222> (1)..(33)

15

<400> 58

aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt ctg ata 33
Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile
1 5 10

20 <210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 59

Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile
1 5 10

<210> 60

30 <211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

35 <221> SAC

ES 2 435 727 T3

<222> (1)..(327)

<400> 60

tct	tct	gag	ctg	act	cag	gac	cct	gct	gtg	tct	gtg	gcc	ttg	gga	cag	48
Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	
1				5					10					15		
aca	gtc	agg	atc	aca	tgc	caa	gga	gac	agc	ctc	aga	agc	tat	tat	gca	96
Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	
			20					25					30			
agc	tgg	tac	cag	cag	aag	cca	gga	cag	gcc	cct	gta	ctt	gtc	atc	tat	144
Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	
		35					40					45				
ggt	aaa	aac	aac	cgg	ccc	tca	ggg	atc	cca	gac	cga	ttc	tct	ggc	tcc	192
Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
	50					55					60					
agc	tca	gga	aac	aca	gct	tcc	ttg	acc	atc	act	ggg	gct	cag	gcg	gaa	240
Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	
					70					75					80	
gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	aac	tcc	cgg	gac	aac	agt	gat	aac	cgt	288
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Asp	Asn	Arg	
				85					90					95		
ctg	ata	ttt	ggc	ggc	ggg	acc	aag	ctg	acc	gtc	ctc	agt				327

5

Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
100 105

<210> 61

10 <211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

15

ES 2 435 727 T3

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

<210> 62

<211> 702

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SAC

10 <222> (1)..(702)

<400> 62

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15	48
gta cat tca tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala 20 25 30	96
ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser 35 40 45	144
tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu 50 55 60	192
gtc atc tat ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe 100 105	240

ES 2 435 727 T3

65					70					75				80		
tct	ggc	tcc	agc	tca	gga	aac	aca	gct	tcc	ttg	acc	atc	act	ggg	gct	288
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	
				85					90					95		
cag	gcg	gaa	gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	aac	tcc	cgg	gac	aac	agt	336
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	
			100					105					110			
gat	aac	cgt	ctg	ata	ttt	ggc	ggc	ggg	acc	aag	ctg	acc	gtc	ctc	agt	384
Asp	Asn	Arg	Leu	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	
		115					120					125				
cag	ccc	aag	gct	gcc	ccc	tcg	gtc	act	ctg	ttc	ccg	ccc	tcc	tct	gag	432
Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	
	130					135					140					
gag	ctt	caa	gcc	aac	aag	gcc	aca	ctg	gtg	tgt	ctc	ata	agt	gac	ttc	480
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	
					150					155					160	
tac	ccg	gga	gcc	gtg	aca	gtg	gcc	tgg	aag	gca	gat	agc	agc	ccc	gtc	528
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	
				165				170						175		
aag	gcg	gga	gtg	gag	acc	acc	aca	ccc	tcc	aaa	caa	agc	aac	aac	aag	576
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	
			180					185					190			
tac	gcg	gcc	agc	agc	tat	ctg	agc	ctg	acg	cct	gag	cag	tgg	aag	tcc	624
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	
		195					200					205				
cac	aga	agc	tac	agc	tgc	cag	gtc	acg	cat	gaa	ggg	agc	acc	gtg	gag	672
His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	
	210				215						220					
aag	aca	gtg	gcc	cct	gca	gaa	tgc	tct	tga							702
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser								
					230											

<210> 63

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 20 25 30

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
 50 55 60

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 65 70 75 80

10

ES 2 435 727 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 85 90 95
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser
 100 105 110
 Asp Asn Arg Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
 115 120 125
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 130 135 140
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 165 170 175
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 195 200 205
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 210 215 220
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado para PDGFR α humano, que comprende SSSYY (SEC ID N $^{\circ}$: 2) en CDRH1; SFFYTGSTYYNPSLRS (SEC ID N $^{\circ}$: 4) en CDRH2; QSTYYYGSGNYYGWFDR (SEC ID N $^{\circ}$: 6) en CDRH3; RASQSVSSYLA (SEC ID N $^{\circ}$: 10) en CDRL1; DASNRAT (SEC ID N $^{\circ}$: 12) en CDRL2; y QQRSNWPPA (SEC ID N $^{\circ}$: 14) en CDRL3
2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRSQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNYGWFDRWDQGTLVTVSS (SEC ID N $^{\circ}$: 8) o una región variable de cadena ligera que tiene EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEC ID N $^{\circ}$: 16).
3. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRSQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNYGWFDRWDQGTLVTVSS (SEC ID N $^{\circ}$: 8) y una región variable de cadena ligera que tiene EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEC ID N $^{\circ}$: 16).
4. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene MGWSCILFLVATATGVHSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRSQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNYYGWFDRWDQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N $^{\circ}$: 31) y una cadena ligera que tiene
**MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
 QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELPEDFAVYYCQQRSN
 WPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC (SEC ID N $^{\circ}$: 33)**
5. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que inhibe la unión de PDGFR α a un ligando de PDGFR α o que neutraliza PDGFR α .
6. Un ácido polinucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de expresión que comprende el ácido polinucleico de la reivindicación 6 unido operativamente a elementos de control de la expresión de modo que se puede expresar el anticuerpo o fragmento codificado.
8. Una célula recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7, célula recombinante que puede producir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo producido cultivando la célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 8 de modo que se produce el anticuerpo o fragmento y se recupera el anticuerpo o fragmento del cultivo.
10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la reivindicación 9 para usar como medicamento.
11. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para usar en la inhibición del crecimiento de un tumor primario, un tumor metastásico, un tumor resistente o un tumor vascularizado en un mamífero.

12. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 11, seleccionándose el tumor de un tumor ovárico, un tumor de mama, un tumor pulmonar, un tumor hepatocelular, un tumor estromal gastrointestinal, un melanoma, un carcinoma de células renales, un tumor de próstata, un tumor óseo, un sarcoma de tejidos blandos, un leiomioma y un glioblastoma.

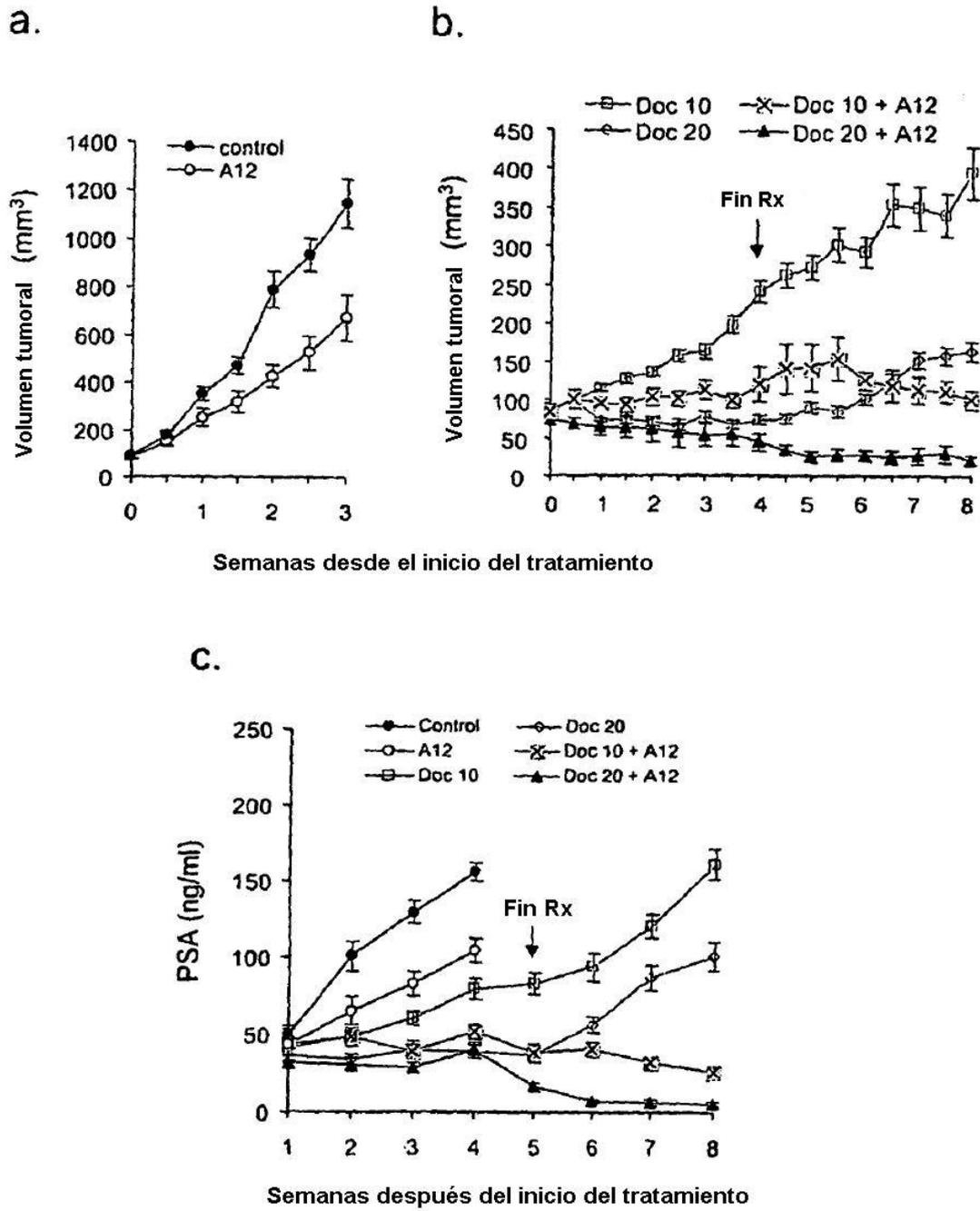


Fig. 1

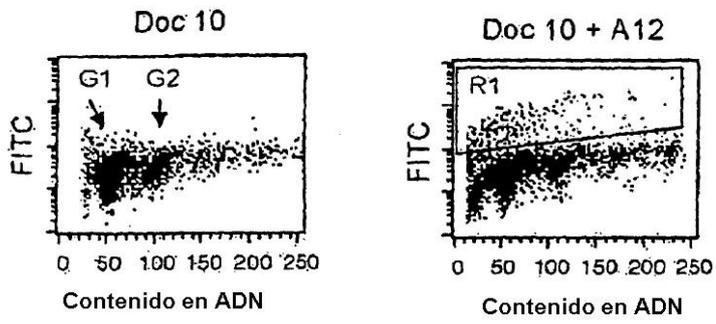


Fig. 2

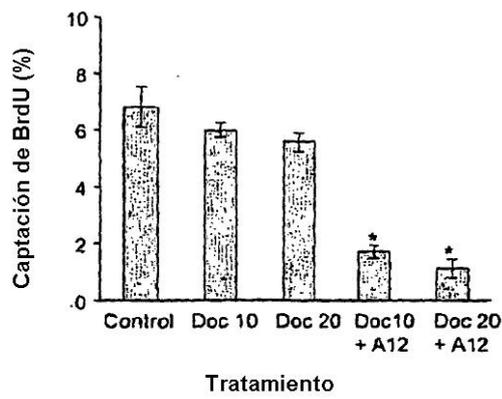


Fig. 3

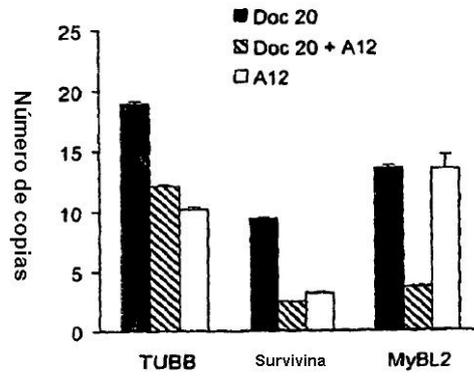


Fig. 4

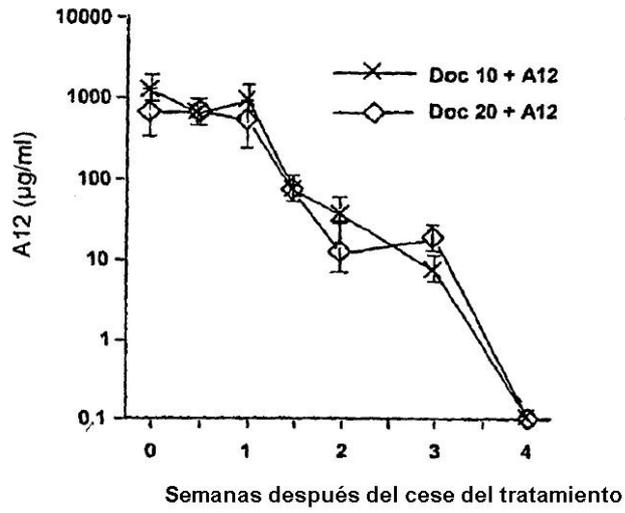


Fig. 5

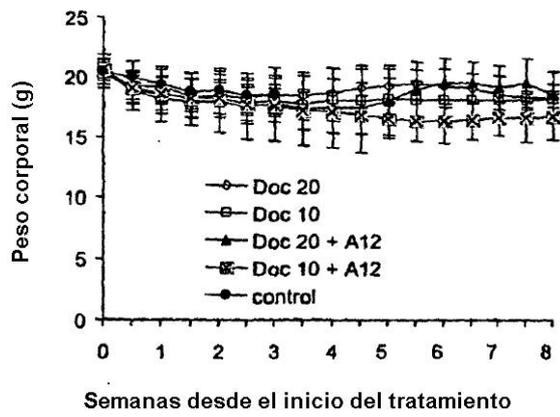


Fig. 6

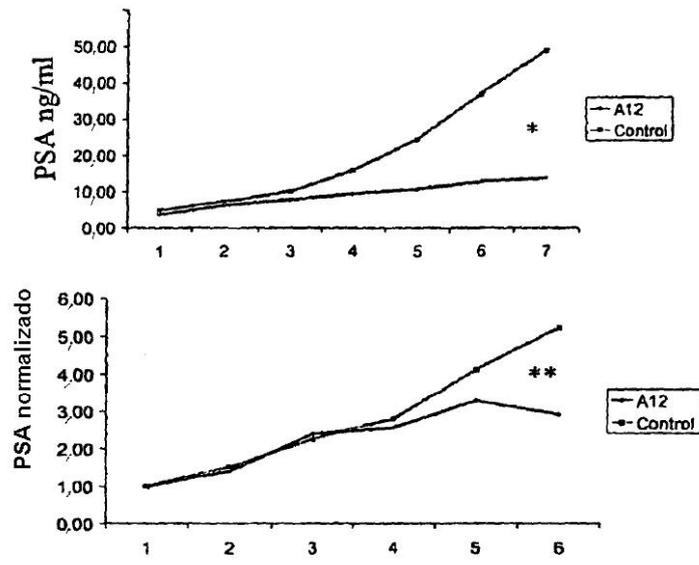


Fig. 7



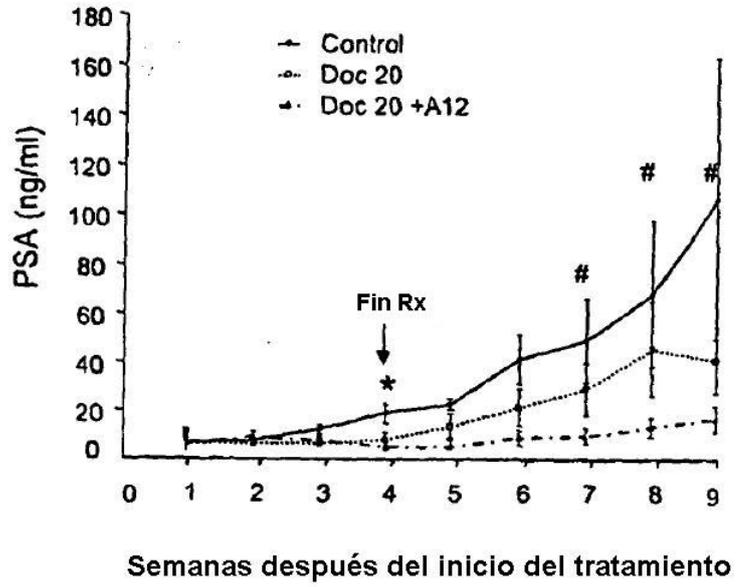
Control



A12

Fig. 8

a.



b.

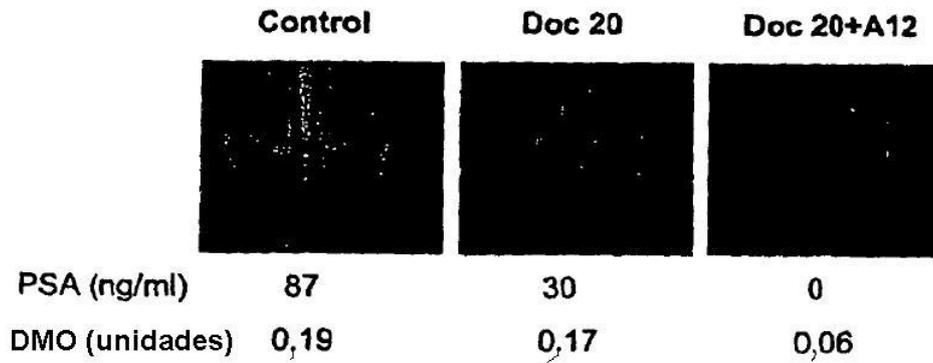


Fig. 9

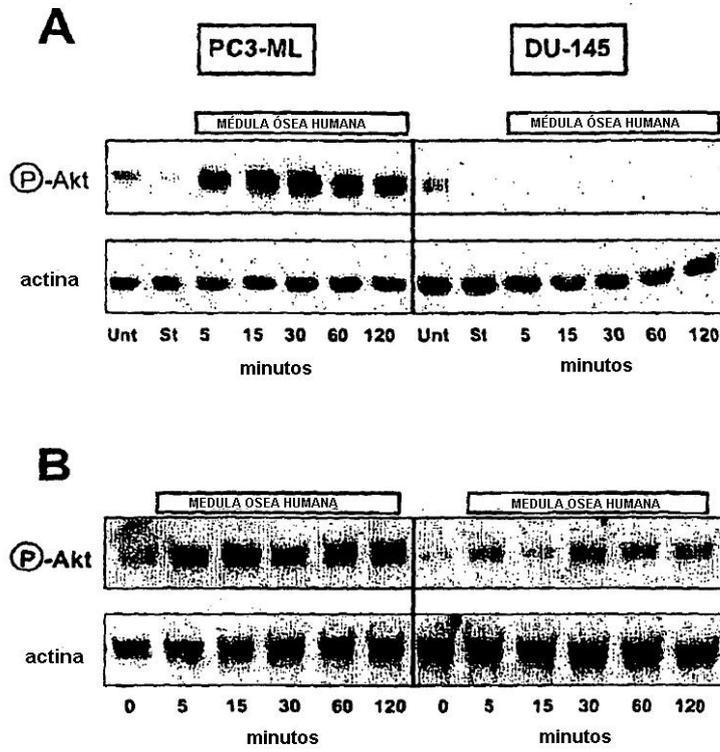


Fig. 10

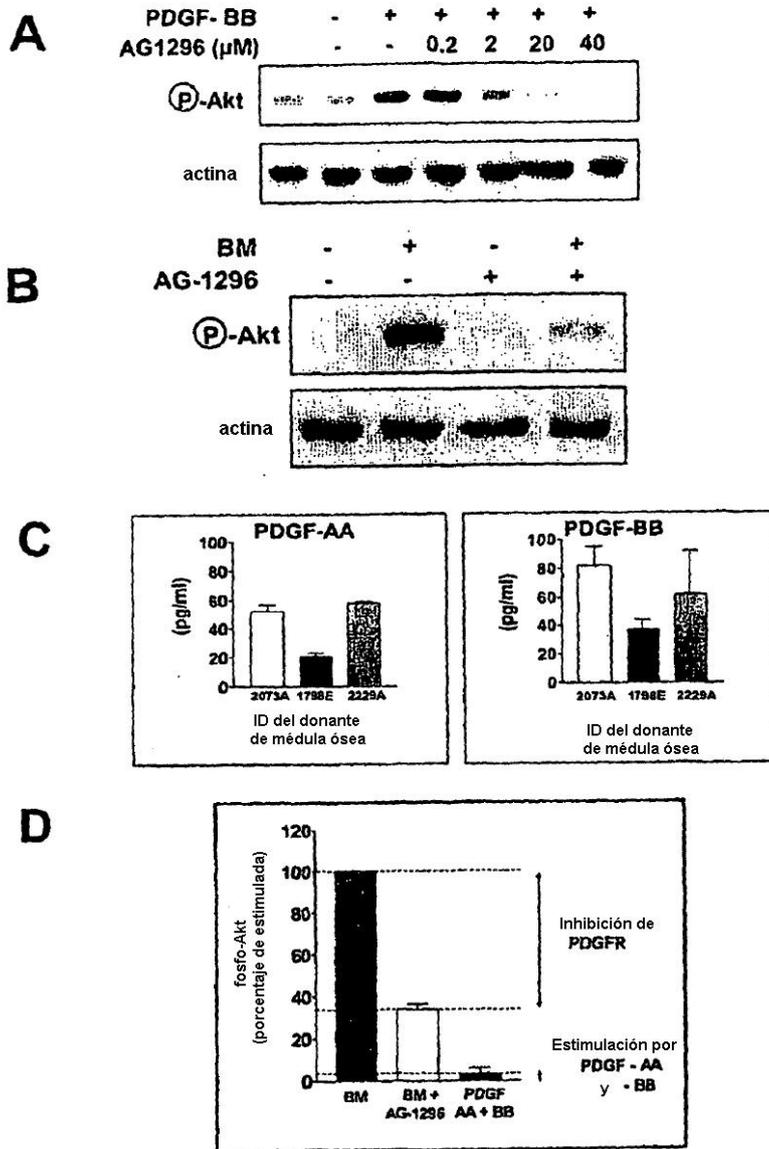


Fig. 11

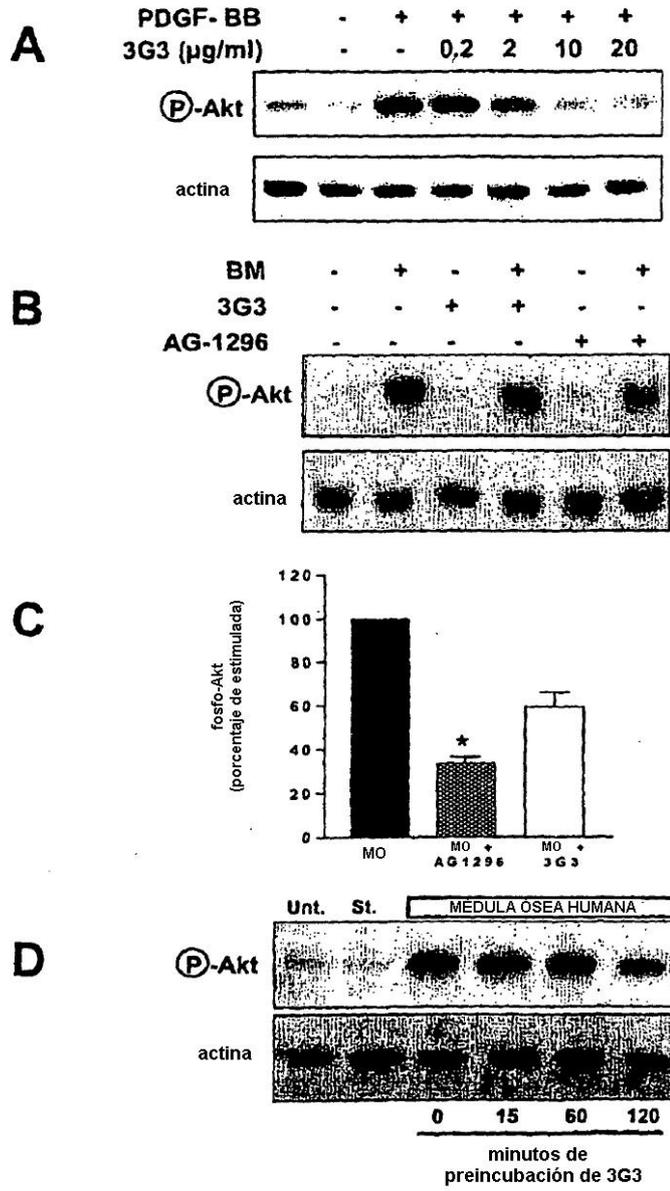


Fig. 12

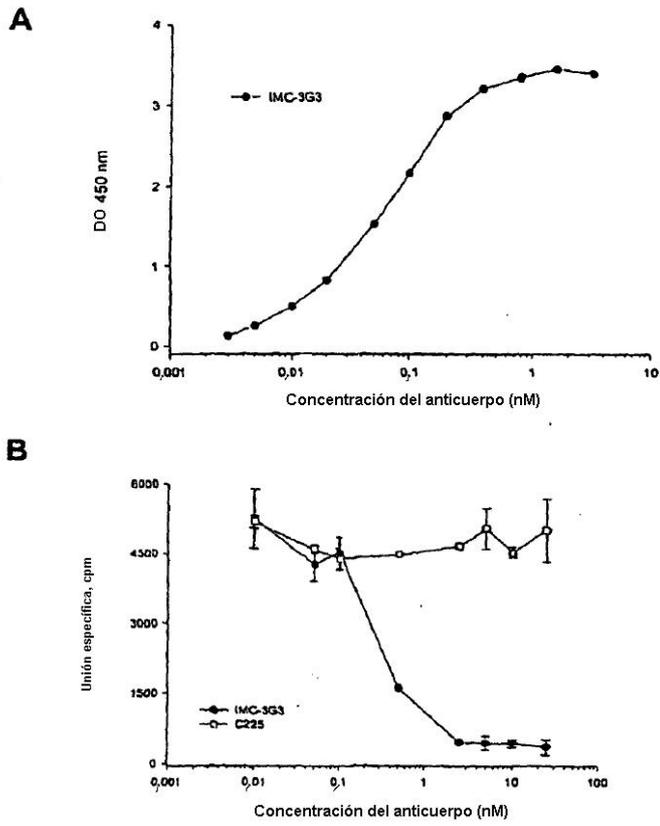


Fig. 13

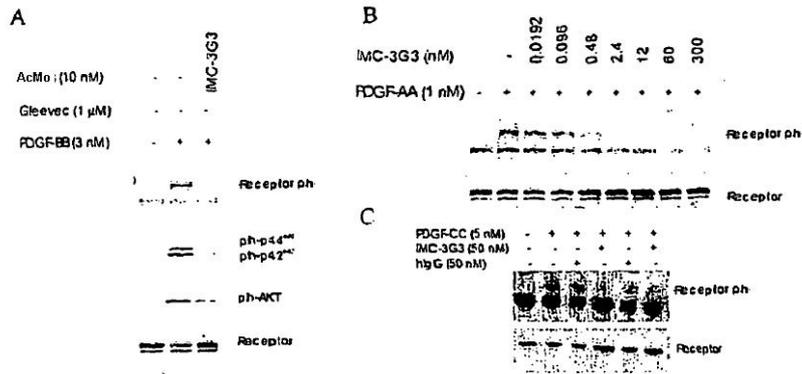


Fig. 14

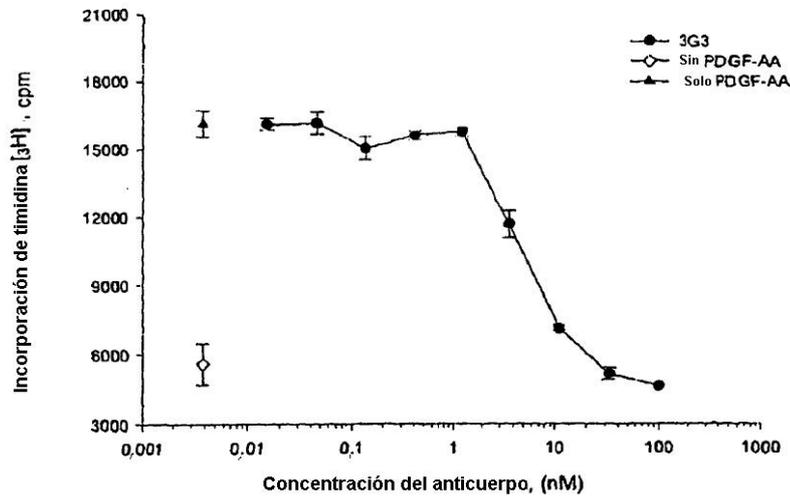


Fig. 15

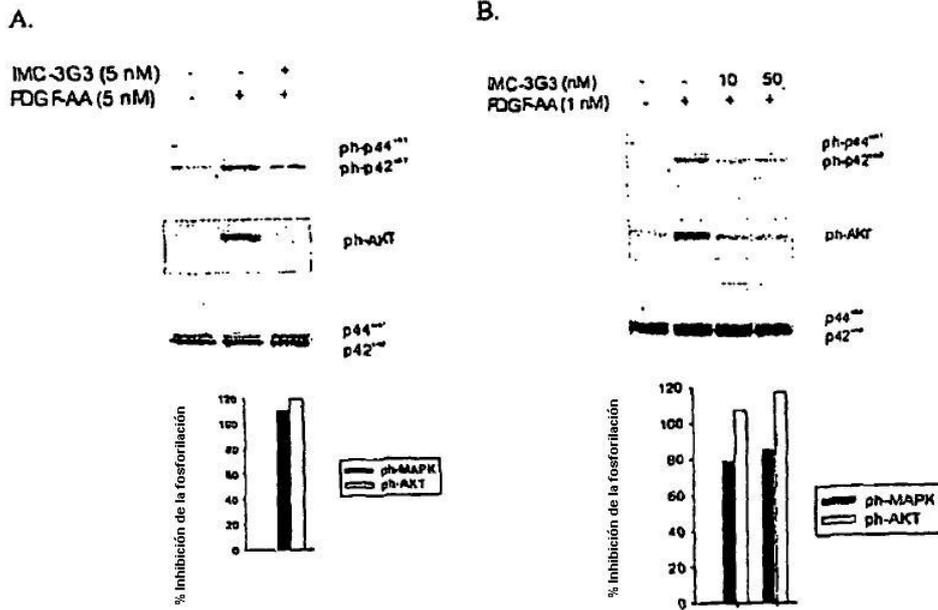


Fig. 16

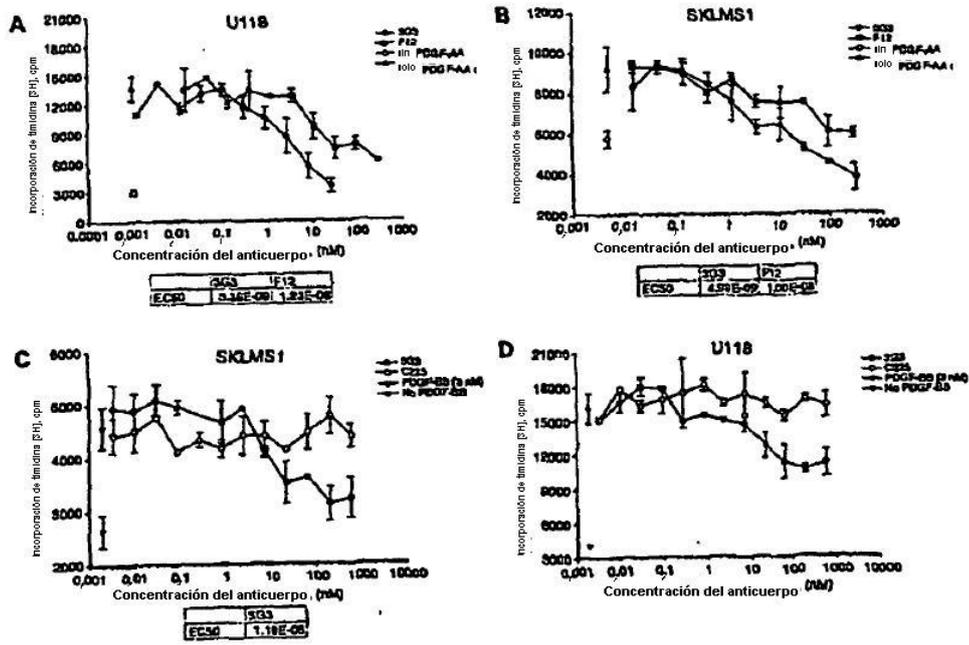


FIG. 17

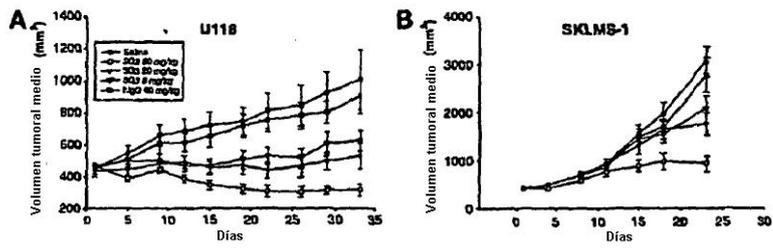


Fig. 18

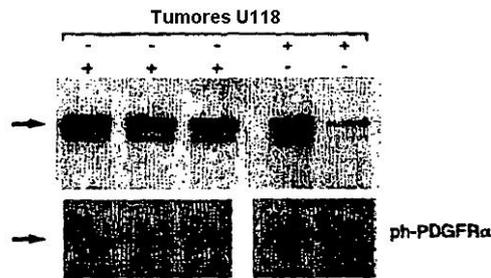


Fig. 19

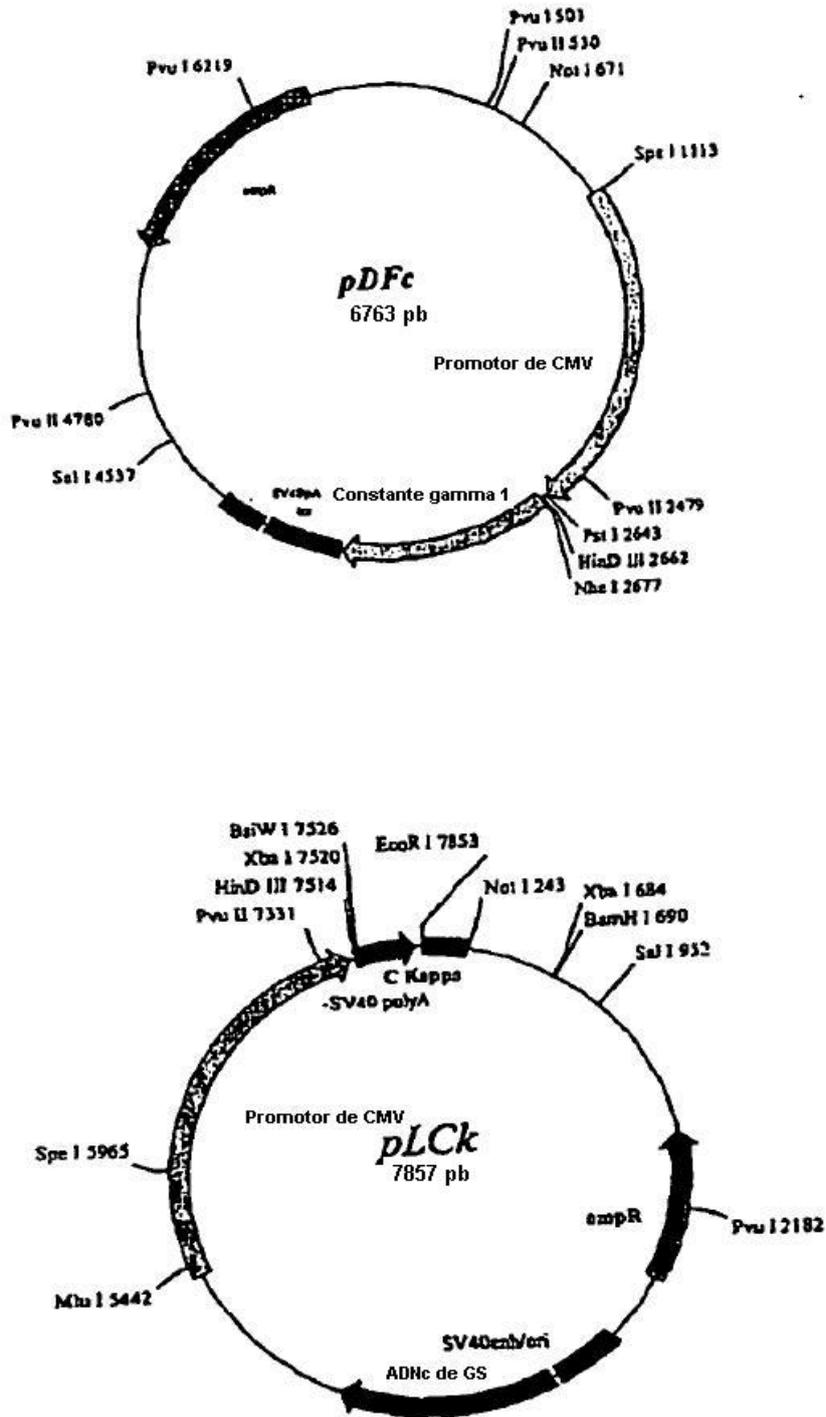


Fig. 20