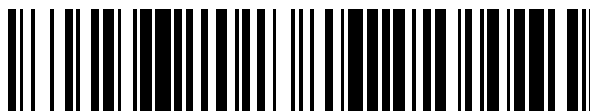


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 045**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2009** **E 09771361 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015** **EP 2376116**

54 Título: **Anticuerpos anti-IGF**

30 Prioridad:

12.12.2008 EP 08171554

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2016

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**ADAM, PAUL y
BORGES, ERIC**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 561 045 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

Anticuerpos anti-IGF

La presente invención se refiere a la terapia de enfermedades hiperproliferativas, en particular a la terapia de cánceres.

5 Antecedentes de la invención

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1; un polipéptido de 70 aminoácidos) y el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2; un polipéptido de 67 aminoácidos) son factores solubles de 7,5 kD presentes en el suero que potencialmente pueden estimular el crecimiento de muchas células de mamíferos (revisado por Pollack et al., 2004). Tras la secreción en el torrente sanguíneo, los IGFs forman complejos con las IGFBPs que los protegen de la degradación proteolítica en el suero en ruta a sus tejidos diana e impiden su asociación con los receptores de los IGFs. Se sabe también que los IGFs son secretados de una manera autocrina o paracrina en los propios tejidos diana. Se sabe que esto ocurre durante el desarrollo fetal normal en el que los IGFs juegan un papel clave en el crecimiento de tejidos, huesos y órganos. También se ve en muchos tejidos cancerosos en los que se piensa que hay una transmisión de señales paracrina entre las células tumorales y las células estromales o la producción autocrina de IGFs por las propias células tumorales (revisado por LeRoith D, 2003).

IGF-1 e IGF-2 son capaces de unirse al receptor de IGF-1 (IGF-1R) expresado en muchos tejidos normales, cuya funcionalidad es un heterotetrámero de 460 kD que consiste en una subunidad alfa y una beta dimerizadas con afinidades similares (Rubin et al., 1995). IGF-2 también se puede unir al receptor de IGF-2, que se piensa previene la unión de IGF-2 y la transmisión de señales a través del IGF-1R. A este respecto, se ha demostrado que IGF-2R es una proteína supresora de tumores. El IGF-1R es estructuralmente similar al receptor de insulina, que existe en dos formas, IR-A e IR-B, los cuales difieren por una delección en el exón de 12 aminoácidos, alternativamente cortado y empalmado en el dominio extracelular de IR-A. IR-B es la isoforma predominante de IR, expresada en la mayoría de tejidos adultos normales en los que actúa para mediar en los efectos de la insulina sobre el metabolismo. Por otra parte, se sabe que IR-A se expresa mucho en los tejidos fetales en desarrollo, pero no en los tejidos normales de los adultos. Estudios recientes también han demostrado que IR-A, pero no IR-B, se expresa mucho en algunos cánceres. La delección del exón en IR-A no tiene ningún impacto sobre la unión a la insulina, pero provoca un pequeño cambio conformacional que permite que el IGF-2 se una con mucha mayor afinidad que para IR-B (Frasca et al., 1999; Pandini et al., 2002). Así, debido a su expresión en tejidos cancerosos y una propensión incrementada a unirse a IGF-2, IR-A puede ser tan importante como IGF1-R en la mediación de los efectos mitogénicos de IGF-2 en el cáncer.

La unión de los IGFs a IGF-1R activa una cascada compleja de transmisión intracelular de señales que da lugar a la activación de proteínas que estimulan la proliferación y la supervivencia (revisado por Pollack et al., 2004).

Al contrario que los receptores EGFR y Her2neu, no hay ninguna amplificación conocida de los receptores IGF1-R o IR-A en cánceres, lo que indica que la activación de los receptores está controlada por la presencia de un ligando activo. Existe una enorme cantidad de bibliografía científica, epidemiológica y clínica que supone un papel a los IGFs en el desarrollo, la progresión y la metástasis de muchos tipos diferentes de cánceres (revisado por Jerome et al., 2003; y Pollack et al., 2004).

Por ejemplo, en el cáncer colorrectal la expresión del ARNm de IGF-2 y de proteína es elevada en muestras clínicas de tumores colorrectales en comparación con el tejido normal adyacente (Freier et al., 1999; Li et al., 2004). También existe una correlación positiva de los niveles elevados de IGFs en suero con el índice de proliferación celular en pacientes con neoplasia colorrectal (Zhao et al., 2005). Además, los niveles elevados en circulación de IGF-2 se correlacionan con un riesgo acrecentado de desarrollar cánceres colorrectales y adenomas (Renehan et al., 2000a) y b); Hassan et al., 2000). La pérdida de sellado parental (LOI - siglas en inglés) del gen de IGF-2, una alteración epigenética que da lugar a una expresión elevada de IGF-2, es un rasgo molecular hereditario que recientemente ha sido identificado en pacientes con un tumor colorrectal y otros tipos de tumores. Se ha mostrado que la pérdida de sellado de IGF-2 está asociada con un riesgo cinco veces superior de neoplasia colorrectal (Cui et al., 2003; Cruz-Correa et al., 2004) y adenomas (Woodson et al., 2004). Se ha mostrado que los anticuerpos que tienen como diana a la subunidad alfa del IGF-1R, la cual bloquea la unión a IGF e internaliza al receptor, retrasan el crecimiento de las líneas de células xenoinjertadas derivadas de cáncer de colon, tales como COLO 205 (Burtrum et al., 2003).

Niveles elevados de IGFs están asociados con una mala prognosis en adenocarcinomas pulmonares de ser humano (Takanami et al., 1996) y los IGFs son expresados y secretados por muchas líneas de células derivadas de SCLC y NSCLC (Quinn et al., 1996). La sobreexpresión transgénica de IGF-2 induce tumores espontáneos en los pulmones en un modelo murino (Moorhead et al., 2003). En términos de carcinoma hepatocelular (HCC), las muestras clínicas de ser humano y los modelos animales de HCC expresan mayores niveles de ARNm de IGF y proteína que los correspondientes tejidos normales y esto ha sido correlacionado con un crecimiento tumoral acrecentado (Wang et al., 2003; Ng et al., 1998). También se ha mostrado que IGF-2 es un marcador serológico de HCC con concentraciones elevadas en el suero de pacientes de HCC en comparación con testigos (Tsai et al., 2005).

Muchos tumores sólidos en la infancia tales como el sarcoma de Ewing y el rabdomiosarcoma parece que son particularmente dependientes para su crecimiento de la ruta de transmisión de señales de los IGF (Scotlandi et al., 1996). La LOI del gen de IGF-2 ha sido implicada como un suceso genético principal en el desarrollo del rabdomiosarcoma embrionario (Fukuzawa et al., 1999). También se piensa que la transmisión de señales autocrina de los IGF influye fuertemente en el crecimiento del sarcoma de Ewing en los casos en los que el factor de transcripción quimérico EWS-FLI1 tipo-1 se expresa a través de una translocación cromosómica que da lugar a una elevada expresión de genes diana que incluyen los ligandos de IGF e IGF-1R, y a una expresión reducida de IGFBP-3. Se ha mostrado que los anticuerpos y los compuestos de moléculas pequeñas que tienen como diana a IGF-1R reducen el crecimiento de tumores sólidos pediátricos xenoinjertados derivados de líneas de células (Kolb et al., 2008; Manara et al., 2007).

Usando anticuerpos específicos para los ligandos de los IGFs se ha demostrado que puede inhibirse el crecimiento de células de cáncer de próstata de ser humano en huesos de seres humanos adultos implantados en ratones SCID (Goya et al., 2004). Además, se demostró que los mismos anticuerpos de ligandos de los IGFs podían bloquear el suministro paracrino de IGFs y suprimir la metástasis en el hígado de células de cáncer colorrectal de ser humano en un sistema de murino xenoinjertado (Miyamoto et al., 2005).

También existe una considerable evidencia que sugiere que el sistema de transmisión de señales de los IGFs reduce la sensibilidad de cánceres a los agentes quimioterapéuticos y a la radiación. Uno de los primeros hallazgos a este respecto fue la demostración de que los embriones de ratones con IGF-1R inactivado son refractarios a la transformación por virus, oncogenes y sobreexpresan a los receptores de los factores de crecimiento (Sell et al., 1993; Sell et al., 1994) y que la sobreexpresión de IGF-1R protege a las células de la apoptosis inducida por la radiación gamma y la irradiación UV (Kulik et al., 1997). Además, usando líneas de células de tumores de hígado que secretan grandes cantidades de IGF-2, se encontró que la neutralización de IGF-2 aumentó significativamente la respuesta a los agentes quimioterapéuticos, tales como cisplatino y etopósido *in vitro*, especialmente a las menores dosis citotáticas, lo que sugiere que IGF-2 puede reducir la susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos (Lund et al., 2004). En consistencia con estos hallazgos, se ha demostrado que los anticuerpos que tienen como diana al IGF-1R aumentan la susceptibilidad de los xenoinjertos tumorales a la inhibición del crecimiento mediante fármacos quimioterapéuticos y radiación (Goetsch et al., 2005).

Se ha informado de un cierto número de anticuerpos que muestran una unión reactiva cruzada con IGF-1 de ser humano e IGF-2 de ser humano. Se hizo crecer el anticuerpo sm1.2 frente a IGF-1 de ser humano y muestra una reactividad cruzada de 40% respecto a IGF-2 de ser humano y se mostró que inhibe la proliferación de una línea de células BALB/c3T3 de fibroblastos de ratones, la cual fue estimulada con 20 ng/mL de IGF-1 de ser humano (Russell et al., 1984). En un estudio diseñado para cartografiar funcionalmente epítomos de IGF-1 haciendo crecer anticuerpos monoclonales de la proteína IGF-1 completa y porciones de la proteína, se identificó un cierto número de anticuerpos que tenían reactividad cruzada con IGF-2 (Manes et al., 1997). El porcentaje de reactividad cruzada con IGF-2 varió de 0 a 800% y se identificaron varios anticuerpos que fueron igualmente reactivos con IGF-1 y con IGF-2. KM1486 es un anticuerpo monoclonal de rata que reacciona cruzadamente con IGF-1 e IGF-2 de ser humano y se mostró que KM1486 puede inhibir el crecimiento de células de cáncer de próstata de ser humano en hueso de ser humano adulto implantado en ratones no obesos diabéticos/con inmunodeficiencia grave combinada (Goya et al., 2004). Además, se demostró que KM1486 suprime la metástasis en el hígado de cánceres colorrectales de ser humano (Miyamoto et al., 2005). KM1486 también se ha descrito en los documentos WO 03/093317, JP 2003-310275, WO 2005/018671, WO 2005/028515 y WO 2005/027970.

Para el tratamiento de las enfermedades de los seres humanos, es muy deseable un anticuerpo con una secuencia completamente de ser humano con el fin de minimizar el riesgo de generar una reacción anti-anticuerpo en el ser humano y neutralizar los anticuerpos que rápidamente eliminarán del cuerpo el anticuerpo administrado y, de este modo, reducirán el efecto terapéutico. Como tal, y dados los papeles de la transmisión de señales dependiente de IGF-1 e IGF-2 en el desarrollo y progreso de cánceres, se ha vuelto deseable obtener anticuerpos completamente humanos. El documento WO 2007/070432 describe anticuerpos completamente humanos que co-neutralizan los efectos mitogénicos de los dos ligandos.

Era un objeto de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos alternativos con elevadas afinidades.

Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con una alta afinidad por IGF-1.

Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con una alta afinidad por IGF-1 y por IGF-2.

Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con afinidades relativas adecuadas por IGF-1 y por IGF-2.

Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con una afinidad mayor por IGF-1 que por IGF-2.

Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con una alta potencia de neutralización de IGF-1.

Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con una alta potencia de neutralización de IGF-1 y de IGF-2.

- 5 Era un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos anti-IGF de seres humanos con una alta solubilidad y estabilidad.

Era un objeto adicional de la invención obtener anticuerpos que no afecten a la unión de la insulina a su receptor.

- 10 El desarrollo clínico de agentes terapéuticos está sustentado por biomarcadores farmacodinámicos de actividad de fármacos. Estudios clínicos con anticuerpos que tienen como diana al IGF-1R han demostrado que un aumento de los niveles totales de IGF-1 en el suero puede ser un marcador farmacodinámico útil de estos agentes (Pollack et al., 2007). La razón del aumento de los niveles totales de IGF-1 en el suero es probablemente debida a un mecanismo de retroalimentación que implica la secreción en la pituitaria de la hormona de crecimiento (GH – siglas en inglés), la cual libera tanto IGF-1 como IGFBPs desde el hígado. Realmente, se ha demostrado en seres humanos que el IGF-1 libre o bioactivo, el cual representa sólo alrededor del 1% de los niveles totales de IGF-1, determina la respuesta de retroalimentación (Chen et al., 2005).

Por lo tanto, un objeto adicional de la invención era proporcionar, para el tratamiento de enfermedades en cuyo desarrollo y/o progreso están causalmente implicados los IGFs, una terapia que va acompañada de un biomarcador que permite la vigilancia farmacológica de la eficacia de la terapia.

- 20 En los experimentos de la presente invención, se pudo demostrar que los niveles totales de IGF-1 en suero son elevados tras la aplicación de los anticuerpos anti-IGF de la invención. Así, niveles de IGF-1 totales son un marcador farmacodinámico útil para la eficacia de la terapia con un anticuerpo anti-IGF. Por lo tanto, es muy ventajoso que los anticuerpos de la invención tengan una reactividad cruzada con los IGFs de especies animales adecuadas, por ejemplo ratones o ratas, de manera que un efecto farmacodinámico pueda ya ensayarse preclínicamente.

- 25 “Niveles totales de IGF-1” se refiere a la cantidad combinada de IGF-1 en plasma o suero que comprende la cantidad de IGF-1 unida a proteínas de unión al suero, más el IGF-1 libre (no ligado).

- 30 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar la eficacia de un tratamiento de un paciente de cáncer con una molécula de anticuerpo que se une a IGF-1 e IGF-2. En un método de este tipo, en una primera etapa, se mide el nivel de IGF-1 total en una muestra biológica del paciente, por ejemplo suero o plasma. Seguidamente, se administra la molécula de anticuerpo y luego, después de un periodo de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo terapéutico ejerza su efecto, se determina de nuevo el nivel de IGF-1 total. La magnitud del aumento en el nivel de IGF-1 total, comparado con el nivel de IGF-1 total medido en la primera etapa, indica en qué medida responde el paciente a dicha molécula de anticuerpo anti-IGF. Este método se utiliza, preferiblemente, para vigilar terapias en las que se administran los anticuerpos de la invención.

- 35 Manes *et al* 1997 Endocrinology 138, 905-915, informan del mapeo del epítipo funcional de IGF-I por parte de anticuerpos monoclonales anti-IGF-I. Para realizar este estudio, los autores generaron un panel de 140 anticuerpos murinos monoclonales cultivados contra IGF-I humano, de los cuales 28 se estudiaron en detalle.

El documento WO2007/070432 describe anticuerpos que se unen preferentemente a IGF-2 con reactividad cruzada a IGF-1, que neutralizan la actividad tanto de IGF-1 como de IGF-2.

Breve descripción de las figuras

- 40 Las Figuras 1A-1G muestran un ensayo ELISA de titulación de la unión de los anticuerpos designados 60814, 60819 y 60833 de IgG1 con el IGF-1 de ser humano (Figura 1A), IGF-1 de ratón (Figura 1B), IGF-1 de rata (Figura 1C), IGF-2 de ser humano (Figura 1D), IGF-2 de ratón (Figura 1E), IGF-2 de rata (Figura 1F) e insulina de ser humano (Figura 1G).

- 45 La Figura 2 muestra titulaciones típicas de anticuerpo 60833 que neutraliza IGF-1 (20 ng/mL)(Figura 2A) e IGF-2 (100 ng/mL)(Figura 2B) inducían la fosforilación del IGF-1R utilizando un ELISA basado en células.

La Figura 3A muestra una titulación típica de anticuerpo 60833 que neutraliza IGF-2 (100 ng/mL) inducía la fosforilación de IR-A. La Figura 3B muestra una titulación típica de anticuerpo 60833 que neutraliza suero humano (20%) inducía la fosforilación del IGF-1R. Ambos ensayos se realizan utilizando ELISAs basados en células.

- 50 Las Figuras 4A-2D muestran el efecto de los anticuerpos 60814 y 60819 sobre la proliferación de células MCF-7 (Figuras 4A y 4B) y COLO 205 (Figuras 4C y 4D) estimulada con IGF-1 (Figuras 4A y 4C) e IGF-2 (Figuras 4B y 4D).

La Figura 5 muestra el efecto de los anticuerpos 60819 y 60833 sobre la proliferación de la línea de células TC-71 derivada del sarcoma de Ewing en medio de crecimiento al 10%.

La Figura 6 muestra el efecto del anticuerpo 60819 sobre los niveles totales en el suero de IGF-1 de murino 24 horas tras la administración de dosis únicas de 25, 12,5, 6,25, 3,13 mg/kg. 0 mg/kg representa los niveles totales de IGF-1 en suero antes del tratamiento con los anticuerpos.

5 La Figura 7 muestra el efecto del anticuerpo 60819 sobre los niveles totales de IGF-1 en plasma de rata, 24 horas tras la administración de dosis únicas de 30, 100, 200 mg/kg mediante infusión intravenosa durante 10 minutos. 0 mg/kg representa los niveles de IGF-1 en suero totales antes del tratamiento con los anticuerpos.

La Figura 8 demuestra el efecto del anticuerpo 60819 y rapamicina, solos o en combinación, sobre la proliferación de la línea de células SK-ES-1 derivada de sarcoma de Ewing en FCS al 10% que contiene medio de crecimiento.

10 La Figura 9 demuestra el efecto del anticuerpo 60819 y rapamicina, solos o en combinación, sobre la fosforilación de AKT y niveles de PTEN.

La Figura 10 demuestra el efecto del anticuerpo 60819 y erlotinib/Tarceva, solos o en combinación, sobre la proliferación de la línea de células A-549 derivada de NSCLC en FCS al 10% que contiene medio de crecimiento.

15 La Figura 11 muestra la estructura en 3D de IGF-1 humano, en que están destacados los aminoácidos unidos por el anticuerpo 60833 (gris oscuro). Debajo se muestra la secuencia lineal de aminoácidos de IGF-1 humano, en que los aminoácidos que interactúan con el anticuerpo 60833 están subrayados.

La Figura 12 muestra las secuencias de aminoácidos y de ADN de las cadenas variables de los anticuerpos 60814 (A), 60819 (B) y 60833 (C); las CDRs están en negrillas.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo aislada de ser humano, la cual

- 20 a) se une a IGF-1 e IGF-2 de ser humano, tal que
- i) se impide la unión de IGF-1 e IGF-2 al receptor de IGF-1 y
 - ii) se inhibe la transmisión de señales mediada por el receptor de IGF-1,
- b) se une a IGF-1 e IGF-2 de ratón y de rata,
- c) no se une a insulina humana;

25 en donde dicha molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo que tiene CDRs de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) y SEQ ID NO:23 (CDR3) y que tiene CDRs de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) y SEQ ID NO:26 (CDR3).

30 La presente invención proporciona una molécula de anticuerpo anti-IGF, en donde dicha molécula de anticuerpo tiene CDRs de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) y SEQ ID NO:23 (CDR3) y CDRs de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) y SEQ ID NO:26 (CDR3).

La presente descripción proporciona también moléculas de anticuerpo anti-IGF que tienen cadenas pesadas y ligeras o CDRs que tienen secuencias de aminoácidos tal como se representan en la Fig. 12A-C.

35 La presente descripción también proporciona una molécula de anticuerpo anti-IGF, en donde dicha molécula de anticuerpo se une a un epítopo no lineal dentro de IGF-1 que comprende las secuencias de aminoácidos LCGAELVDALQFVCGDR (SEQ ID NO:41) y CCFRSCDLRRLEM (SEQ ID NO:42) de IGF-1 humano (SEQ ID NO:43). En una realización preferida, dicha molécula de anticuerpo hace contacto con al menos 8 aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos LCGAELVDALQFVCGDR (SEQ ID NO:41), y al menos 10 aminoácidos

40 dentro de la secuencia de aminoácidos CCFRSCDLRRLEM (SEQ ID NO:42) de IGF-1 humano (SEQ ID NO:43). En una realización preferida adicional, dicha molécula de anticuerpo hace contacto con Leu (5), Cys (6), Glu (9), Leu (10), Asp (12), Ala (13), Phe (16), Val (17), Arg (21), Cys (47), Cys (48), Phe (49), Ser (51), Cys (52), Asp (53), Leu (54), Arg (55), Leu (57) y Glu (58) de IGF-1 humano (SEQ ID NO:43), según se determina mediante cristalografía de rayos X. Un método respectivo se describe en el Ejemplo 9 de esta memoria. Preferiblemente, dicha molécula de

45 anticuerpo tiene CDRs de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) y SEQ ID NO:23 (CDR3) y tiene CDRs de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) y SEQ ID NO:26 (CDR3).

50 La unión del anticuerpo se define como la interacción que se produce a través de los enlaces no covalentes que retienen el antígeno (o una proteína o un fragmento del mismo que es estructuralmente similar) al sitio de combinación del anticuerpo, es decir, la región de la inmunoglobulina que se combina con el determinante de un antígeno apropiado (o una proteína estructuralmente similar).

La afinidad (es decir, la interacción entre un solo sitio de unión al antígeno en un anticuerpo y un solo epítipo) se expresa por la constante de asociación $K_A = k_{\text{ass}}/k_{\text{diss}}$ o la constante de disociación $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$.

En un aspecto de acuerdo con a), el anticuerpo se une a cada proteína IGF con una afinidad, según se determina por el análisis de resonancia por plasmón de superficie, oscilando un valor K_D de 0,02 nM a 2 nM, p. ej., 0,2 nM a 2 nM, por ejemplo con una afinidad de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ó 1,0 nM. Basado en esta propiedad, se consigue la neutralización de la transmisión funcional de señales de IGF.

En un aspecto de acuerdo con c), el anticuerpo no se une a insulina humana a concentraciones que son al menos 100 veces más altas que la concentración mínima requerida para la unión a IGF-1 o IGF-2 humana.

En otro aspecto, la propiedad de la molécula de anticuerpo anti-IGF definida en c) se caracteriza por el hecho de que la afinidad de la molécula de anticuerpo anti-IGF por IGF-1 e IGF-2, respectivamente, es al menos 100 veces, e incluso más preferiblemente más de 1000 veces, en comparación con su afinidad por la insulina. Incluso a pesar de que a dosis muy elevadas, por ejemplo más de 100 mg/kg, no se puede excluir por completo una débil unión, la molécula de anticuerpo anti-IGF no se une a insulina a dosis terapéuticas.

En una realización, las moléculas de anticuerpo de la invención no afectan a las propiedades mitogénicas de la insulina humana que son mediadas por su unión al receptor de insulina. (En general, una propiedad mitogénica se define como la capacidad de un compuesto para alentar a una célula para comenzar la división celular, desencadenando la mitosis, p. ej. en el caso de insulina, su capacidad para fomentar el desarrollo celular).

En otra realización, además de su capacidad para inhibir la transmisión de señales mediada a través del receptor de IGF-1, un anticuerpo de la invención también tiene la capacidad de inhibir la transmisión de señales de IGF-2 mediada a través del receptor IR-A de la insulina.

Los anticuerpos de la invención tienen una potencia de neutralización sorprendentemente elevada hacia IGF-1 e IGF-2. Además, tienen una potencia y afinidad de unión inesperadamente superior hacia IGF-1 que hacia IGF-2. Tienen una elevada solubilidad y estabilidad, están exentos de motivos de glicosilación o hidrólisis indeseables en el dominio variable y tienen una larga semivida en la circulación.

Descripción detallada de la invención

En lo que sigue, una molécula de anticuerpo de la invención, que se une a IGF-1 e IGF-2 humana, se denomina "molécula de anticuerpo anti-IGF".

La expresión "molécula de anticuerpo anti-IGF" engloba anticuerpos anti-IGF de ser humano, fragmentos de anticuerpos anti-IGF, moléculas semejantes a anticuerpos anti-IGF y conjugados con cualquiera de las moléculas de anticuerpos anteriormente mencionadas. En el significado de la presente invención, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, monoclonales quimerizados, y anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos. El término "anticuerpo" englobará inmunoglobulinas completas como son producidas por los linfocitos y, por ejemplo, están presentes en los sueros sanguíneos, anticuerpos monoclonales secretados por líneas de células de hibridomas, polipéptidos producidos por expresión recombinante en células hospedantes, que tienen especificidad para unión de inmunoglobulinas o anticuerpos monoclonales, y moléculas que han sido derivadas de tales inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales, o polipéptidos mediante procesamiento adicional aunque reteniendo su especificidad por la unión.

En particular, la expresión "molécula de anticuerpo" incluye inmunoglobulinas completas completamente de ser humano que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, preferiblemente.

En otro aspecto, la molécula de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo anti-IGF que tiene una región de unión al antígeno. Para obtener fragmentos de anticuerpo, por ejemplo fragmentos Fab, la digestión puede conseguirse por medio de técnicas rutinarias, p. ej., usando papaína o pepsina. En los documentos WO 94/29348 y US 4.342.566 se describen ejemplos de digestión con papaína. La digestión con papaína de anticuerpos produce típicamente dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, los denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina da un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y es todavía capaz de reticular al antígeno. Los fragmentos de anticuerpos también pueden generarse por métodos de biología molecular que producen los respectivos fragmentos de ADN codificante.

Los fragmentos Fab también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que contienen residuos adicionales en el término carboxi del dominio CH_1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente memoria, Fab'-SH es la designación de Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' los cuales tienen cisteínas bisagra entre ellos.

Los fragmentos de anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpos, que incluyen anticuerpos de una única cadena y anticuerpos lineales que son descritos por Zapata et al., 1995, de unión de antígenos, pueden comprender,

en un único polipéptido, la(s) región(es) variables sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de lo siguiente: dominio constante de la cadena ligera, dominios CH1, región bisagra, dominios CH2, y CH3, por ejemplo una molécula denominada "SMIP" ("Inmunofarmacéutica Modular Pequeña"), que es una molécula semejante a un anticuerpo que emplea una única cadena de polipéptido como su dominio de unión Fv, el cual está unido a una única cadena bisagra y a dominios efectores desprovistos del dominio constante CH1 (documento WO 02/056910). Las SMIPs pueden prepararse como monómeros o dímeros, pero no asumen la estructura dímica de dímeros de los anticuerpos tradicionales. También están incluidos en la invención fragmentos de unión de antígenos que comprenden cualquier combinación de una o varias regiones variables con una región de dominio constante de una cadena ligera, VH1, CH1, región bisagra, y dominios CH2 y CH3.

Los fragmentos de anticuerpos o las moléculas semejantes a anticuerpos pueden contener toda o sólo una porción de la región constante en tanto y cuanto exhiban una unión específica con la porción relevante de los antígenos IGF-1/IGF-2. La elección del tipo y longitud de la región constante depende, si no se desea ninguna función efectora como la fijación de complemento o la toxicidad celular dependiente del anticuerpo, principalmente de las propiedades farmacológicas deseadas de la proteína anticuerpo. La molécula de anticuerpo será típicamente un tetrámero que consiste en dos pares de cadena ligera/cadena pesada, pero también puede ser un dímero, es decir, que consiste en un par de cadena ligera/cadena pesada, por ejemplo un fragmento Fab o Fv, o puede ser un anticuerpo monómero de una única cadena (scFv).

Las moléculas semejantes a anticuerpos anti-IGF también pueden ser anticuerpos de un único dominio (p. ej., los denominados "nanocuerpos"), los cuales albergan un sitio de unión de antígenos en un único dominio semejante a Ig (descrito, p. ej., en el documento WO 03/050531, y por Revets et al., 2005). Otros ejemplos de moléculas semejantes a anticuerpos son los anticuerpos de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF; Srinivasan y Roeske, 2005), o moléculas que contienen CDRs o injertadas en CDRs o "Anticuerpos Dominio" (dAbs). Los dAbs son unidades de unión funcionales de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de anticuerpos de ser humano. Los anticuerpos dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o menos de la décima parte del tamaño de un anticuerpo completo. Se ha desarrollado una serie de genotecas grandes y altamente funcionales de VH y VL dAbs completamente de ser humano. Los dAbs también están disponibles para "dianas dobles", es decir, dAbs que se unen, además de a IGF-1/IGF-2, a otra diana en una molécula. En, por ejemplo, los documentos US 6.696.245, WO 04/058821, WO 04/003019 y WO 03/002609 se describen genotecas dAb, métodos de selección y exploración, formatos dAb para dianas dobles y para conferir una semivida extendida al suero.

En general, los fragmentos de anticuerpos y las moléculas semejantes a anticuerpos se expresan bien en sistemas bacterianos, levaduras y células de mamíferos.

Una molécula de anticuerpo de esta descripción tiene una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (esta secuencia puede contener, en su extremo C, una Gln adicional. Esta posición de los aminoácidos se puede considerar el extremo C-terminal de la región variable, de acuerdo con la numeración de Kabat o, alternativamente, y en línea con las secuencias en el listado de secuencias, se puede representar el primer aminoácido de la cadena ligera constante, véase la SEQ ID NO:34).

Preferiblemente, un anticuerpo con la cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 tiene una región de cadena pesada constante de IgG1. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo tiene una región de cadena ligera constante de Igλ. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo es el anticuerpo designado 60814, que tiene una región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 y una región constante de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. Las secuencias de aminoácidos completas del anticuerpo designado 60814 se representan en la SEQ ID NO:35 (cadena pesada) y la SEQ ID NO:36 (cadena ligera).

Una molécula de anticuerpo de esta descripción tiene una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 (esta secuencia puede contener, en su extremo C, una Gln adicional. Esta posición de los aminoácidos se puede considerar el extremo C-terminal de la región variable, de acuerdo con la numeración de Kabat o, alternativamente, y en línea con las secuencias en el listado de secuencias, se puede representar el primer aminoácido de la cadena ligera constante, véase la SEQ ID NO:34).

Preferiblemente, un anticuerpo con la cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 tiene una región de cadena pesada constante de IgG1. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo tiene una región de cadena ligera constante de Igλ. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo es el anticuerpo designado 60819, que tiene una región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 y una región constante de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. Las secuencias de aminoácidos completas del anticuerpo designado 60819 se representan en la SEQ ID NO:37 (cadena pesada) y la SEQ ID NO:38 (cadena ligera).

El anticuerpo de la invención tiene una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 (esta secuencia puede contener, en su extremo C, una Gln adicional. Esta posición de los aminoácidos se puede considerar el extremo C-terminal de la región variable, de acuerdo con la numeración de Kabat o, alternativamente, y en línea con las secuencias en el listado de secuencias, se puede representar el primer aminoácido de la cadena ligera constante, véase la SEQ ID NO:34).

Preferiblemente, un anticuerpo con la cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 tiene una región de cadena pesada constante de IgG1. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo tiene una región de cadena ligera constante de Igλ. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo es el anticuerpo designado 60833, que tiene una región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 y una región constante de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. Las secuencias de aminoácidos completas del anticuerpo designado 60833 se representan en la SEQ ID NO:39 (cadena pesada) y la SEQ ID NO: 40 (cadena ligera).

La reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención con IGF-1 de ratón y rata permite examinar sus efectos endocrinos, p. ej., el efecto sobre la ruta de la hormona del crecimiento, en estas especies. La reactividad cruzada con los IGFs de rata es particularmente ventajosa, debido a que la rata es un modelo de animal excelente que se utiliza preferiblemente en el desarrollo de fármacos para estudiar los efectos toxicológicos.

El efecto farmacodinámico observado de los anticuerpos sobre los niveles totales de IGF-1, probablemente debido a la eliminación de IGF-1 libre, que da lugar a la regulación por retroalimentación por medio de la ruta de la hormona del crecimiento que da lugar a una secreción acrecentada de IGF-1 en el hígado, es un marcador farmacodinámico útil. La disponibilidad de tal marcador en especies animales, la cual permite la determinación de una relación dosis/efecto en una fase temprana del desarrollo de fármacos, facilita la preparación de estudios clínicos en Fase I, en los que, además del análisis PK, se vigila la respuesta farmacodinámica sobre las concentraciones totales de IGF-1 en pacientes.

La molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención también puede ser una variante de un anticuerpo según se define por la secuencia de aminoácidos mostrada en el listado de secuencias. Así, la invención también abarca anticuerpos que son variantes de estos polipéptidos, que tienen los rasgos a) a c) definidos anteriormente. Usando tecnologías rutinariamente disponibles, un experto en la técnica será capaz de preparar, ensayar y utilizar variantes funcionales de los anticuerpos 60814, 60819 y 60833. Son ejemplos anticuerpos variantes con al menos una posición en una CDR y/o marco alterado, anticuerpos variantes con una única sustitución de aminoácido en la región marco en la que hay una desviación de la secuencia de la línea germinal, anticuerpos con sustituciones amino conservadoras, anticuerpos que están codificados por moléculas de ADN que se hibridan, en condiciones rigurosas, con las moléculas de ADN presentadas en el listado de secuencias que codifican las cadenas variables anticuerpos de 60833, variantes codón optimizadas funcionalmente equivalentes de 60833.

También puede obtenerse una variante usando un anticuerpo de la invención como punto de partida para optimizar y diversificar uno o más residuos aminoácidos, preferiblemente residuos aminoácidos en una o más CDRs, y explorando la colección resultante de variantes de anticuerpos con respecto a variantes con propiedades mejoradas. Es particularmente preferida la diversificación de uno o más residuos aminoácidos en la CDR3 de la cadena variable ligera, CDR3 de la cadena variable pesada, CDR1 de la cadena variable ligera y/o CDR2 de la cadena variable pesada. La diversificación puede hacerse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo la tecnología denominada TRIM referida en el documento WO 2007/042309.

Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales, pueden realizarse sustituciones racionales para obtener variantes de anticuerpos que conserven la estructura molecular completa del anticuerpo 60833. Las sustituciones con aminoácidos, es decir, las "sustituciones conservadoras", pueden, por ejemplo, hacerse sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o la naturaleza anfipática del aminoácido respectivo. El experto es familiar con las sustituciones con aminoácidos usualmente practicadas, que, por ejemplo, se describen en el documento WO 2007/042309, y con los métodos para obtener anticuerpos así modificados. Dado el código genético y las técnicas de ADN recombinante y sintético, las moléculas de ADN que codifican anticuerpos variantes con uno o más intercambios conservadores de aminoácidos pueden diseñarse rutinariamente y obtenerse fácilmente los respectivos anticuerpos.

Variantes preferidas de anticuerpos tienen una identidad de secuencias en las regiones variables de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% u 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y mucho más preferiblemente al menos 95%. Anticuerpos preferidos también tienen una similitud de secuencias en las regiones variables de al menos 80%, más preferiblemente 90% y mucho más preferiblemente 95%.

(La "identidad de secuencias" entre dos secuencias de polipéptidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. La "similitud de secuencias" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras con aminoácidos).

En otra realización, la molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención es un anticuerpo de "afinidad madurada".

Un anticuerpo anti-IGF de "afinidad madurada" es un anticuerpo anti-IGF derivado de un anticuerpo anti-IGF parental, p. ej. 60814, 60819 ó 60833, que tiene una o más alteraciones en una o más CDRs o en que una o más CDRs completas han sido reemplazadas, lo cual da lugar a una mejora de la afinidad por los antígenos, comparada con el respectivo anticuerpo parental. Uno de los procedimientos para generar tales anticuerpos mutantes implica la manifestación en fagos (Hawkins et al., 1992; y Lowman et al., 1991). En síntesis, se hacen mutar varios sitios de regiones hipervariables (p. ej., 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los mutantes de anticuerpos, así generados, se manifiestan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III del fago M13 empaquetados dentro de cada partícula. Los mutantes manifestados por los fagos se exploran entonces respecto a su actividad biológica (p. ej., la afinidad de unión) como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos de afinidad madurados también pueden producirse por métodos como, por ejemplo, se describen por Marks et al., 1992, (maduración de la afinidad barajando dominios de cadena variable pesada (VH) y cadena variable ligera (VL)), o Barbas et al., 1994; Shier et al., 1995; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995; y Hawkins et al., 1992, (mutagénesis aleatoria de residuos CDR y/o marco). Los anticuerpos de afinidad madurados preferidos tendrán afinidades muy elevadas, p. ej., picomolar bajo, para el antígeno diana.

La presente invención también se refiere a moléculas de ADN que codifican una molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención. Estas secuencias incluyen, pero no se limitan a, las moléculas de ADN que codifican los anticuerpos 60833 que se muestran en los listados de secuencias: SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:29, respectivamente, que codifican, respectivamente, las cadenas variables pesada y ligera del anticuerpo 60833.

Las secuencias mostradas en las SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:19 y 29, que codifican las cadenas ligeras variables, pueden contener, en su extremo 3', un codón adicional para Gln.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que se hibridan con las moléculas de ADN recogidas en el listado de secuencia en condiciones de lavado y de enlace muy rigurosas, como se define en el documento WO 2007/042309, en el que tales moléculas de ácido nucleico codifican un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales que tiene propiedades equivalentes o superiores al anticuerpo 60833. Las moléculas preferidas (desde una perspectiva del ARNm) son las que al menos tienen 75% u 80% (preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% y mucho más preferiblemente al menos 95%) de homología o identidad de secuencias con una de las moléculas de ADN descritas en la presente memoria.

Aún otra clase de variantes de ADN que están dentro del alcance de la invención pueden definirse con referencia al polipéptido que codifican. Estas moléculas de ADN se desvían con respecto a su secuencia de las representadas en el listado de secuencias (SEQ ID NOs:27, 29, respectivamente), pero codifican, debido a la degeneración del código genético, anticuerpos con las secuencias de aminoácidos idénticas de los anticuerpos 60833, respectivamente. A modo de ejemplo, con el fin de expresar los anticuerpos 60833 en células eucariotas, los últimos nueve nucleótidos, respectivamente, que codifican los tres últimos aminoácidos de las cadenas variables ligeras, se pueden diseñar para que equivalgan al uso del codón en células eucariotas. Si se desea expresar los anticuerpos en *E. coli*, estas secuencias se pueden modificar para que equivalgan al uso del codón en *E. coli*.

Variantes de moléculas de ADN de la invención pueden construirse de varias formas diferentes, tal como se describe en el documento WO 2007/042309.

Para producir las moléculas de anticuerpos anti-IGF recombinantes de la invención, las moléculas de ADN (ADNc y/o ADN genómico) que codifican la cadena ligera de longitud completa y la cadena pesada o fragmentos de las mismas, se insertan en vectores de expresión, de modo que las secuencias están operativamente enlazadas a secuencias de control transcripcionales y de traducción.

En el caso del anticuerpo 60833, las secuencias son las de SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:33, y SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:31, respectivamente.

Para fabricar los anticuerpos de la invención, el operario experto puede elegir de una gran diversidad de sistemas de expresión bien conocidos en la técnica, por ejemplo los revisados por Kipriyanow y Le Gall, 2004.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable de una molécula de anticuerpo según se describe antes. Preferiblemente, un vector de expresión de este tipo contiene una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:27 y/o SEQ ID NO:29. Preferiblemente, un vector de expresión de este tipo comprende adicionalmente una molécula de ADN que codifica la cadena pesada constante y/o la cadena ligera constante, respectivamente, enlazadas a la molécula de ADN que codifica la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable, respectivamente.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV, y semejantes. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la

- célula hospedante. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En ciertas realizaciones, ambas secuencias de ADN se insertan en el mismo vector de expresión. Vectores convenientes son aquellos que codifican una secuencia de inmunoglobulina humana PC (pesada constante) o LC (ligera constante) funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados
- 5 tratados por ingeniería genética, de modo que cualquier secuencia PV (pesada variable) o LV (ligera variable) se puede insertar y expresar fácilmente, según se describe antes. En el caso de los anticuerpos con las regiones variables de 60814, 60819 y 60833, la cadena constante es usualmente kappa o lambda para la cadena ligera del anticuerpo, y para la cadena pesada puede ser, sin limitación alguna, cualquier isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) o de otras inmunoglobulinas, incluyendo las variantes alélicas.
- 10 El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula hospedante. El ADN que codifica la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector, de modo que el péptido señal esté enlazado en marco al extremo amino terminal del ADN de la cadena del anticuerpo maduro. El péptido señal puede ser un péptido señal tipo inmunoglobulina o un péptido heterólogo de una proteína que no sea una inmunoglobulina. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la cadena del
- 15 anticuerpo ya puede contener una secuencia del péptido señal.
- Además de las secuencias de ADN de las cadenas de los anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes portan secuencias reguladoras que incluyen promotores, potenciadores, señales de terminación y de poliadenilación y otros elementos de control de la expresión que controlan la expresión de las cadenas del anticuerpo en una célula hospedante. Ejemplos de secuencias de promotores (ejemplificados para la expresión en células de mamíferos) son
- 20 promotores y/o potenciadores derivados de CMV (tal como el promotor/potenciador de CMV virus de simio 40 (SV40)), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores derivados de poliomias y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores nativos de inmunoglobulinas y actinas. Ejemplos de señales de poliadenilación son BGH poliA, SV40 tardío o poliA temprano; alternativamente, pueden usarse 3'UTRs de genes de inmunoglobulinas, etc.
- 25 Los vectores de expresión recombinantes también pueden portar secuencias que regulen la replicación del vector en células hospedantes (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada o una de sus porciones de unión de antígenos y/o la cadena ligera o una de sus porciones de unión de antígenos de un anticuerpo anti-IGF, y vectores que comprenden estas moléculas de ADN pueden introducirse en células hospedantes, p. ej., células bacterianas o células eucariotas superiores, por
- 30 ejemplo células de mamíferos, según métodos de transfección bien conocidos en la técnica, que incluyen la transfección mediada por liposomas, la transfección mediada por policationes, la fusión de protoplastos, las microinyecciones, la precipitación con fosfato de calcio, la electroporación o la transferencia mediante vectores víricos.
- Preferiblemente, las moléculas de ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera están presentes en dos
- 35 vectores que están co-transfectados en la célula hospedante, preferiblemente una célula de mamífero.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula hospedante que porta uno o más vectores de expresión según se describe antes, preferiblemente una célula de mamífero.
- Líneas de células de mamíferos disponibles como hospedantes para llevar a cabo la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, entre otros, células de ovarios de hámster chino (CHO), NSO, células SP2/0, células HeLa,
- 40 células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma de ser humano (por ejemplo, células Hep G2 y A-549), células 3T3 o los derivados/progenias de cualquiera de tales líneas de células. Pueden usarse otras células de mamíferos, que incluyen pero no se limitan a, líneas de células de ser humano, ratones, ratas, monos y roedores, u otras células eucariotas, que incluyen pero no se limitan a, células de levadura, insectos y plantas, o células procariotas tales como las bacterias. Las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención se producen cultivando las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para
- 45 permitir la expresión de la molécula del anticuerpo en las células hospedantes.
- Así, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir una molécula de anticuerpo según se describe, que comprende transfectar una célula hospedante de mamífero con uno o más vectores según se describe, cultivar la célula hospedante y recuperar y purificar el anticuerpo. En otra realización, la presente
- 50 invención se refiere a un método para producir un anticuerpo según se describe antes, que comprende obtener una célula hospedante de mamífero que comprende uno o más vectores según se describe, y cultivar la célula hospedante. En otra realización, el método comprende, además, recuperar y purificar el anticuerpo.
- Las moléculas de anticuerpos se recuperan preferiblemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado o pueden recuperarse de lisados de células hospedantes si, por ejemplo, se expresan sin una señal secretora. Es
- 55 necesario purificar las moléculas del anticuerpo usando métodos estándares de purificación de proteínas usados para proteínas recombinantes y proteínas de células hospedantes de una manera que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas del anticuerpo. A modo de ejemplo, los métodos de purificación del estado conocido de la técnica, útiles para obtener la molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención incluyen, como una primera etapa, la separación de las células y/o de los desechos celulares en forma de partículas del medio de cultivo o del

lisado. A continuación, el anticuerpo se purifica de las proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos contaminantes solubles, por ejemplo por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio de iones, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en Sephadex, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio de cationes. Como etapa final del procedimiento para obtener una preparación de molécula de anticuerpo anti-IGF, la molécula de anticuerpo purificada puede secarse, por ejemplo liofilizarse, como se describe más adelante para las aplicaciones terapéuticas.

En una realización, la molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención puede ser purificada mediante una secuencia de etapas de purificación del estado conocido de la técnica que comprenden cromatografía de afinidad (Proteína A recombinante), inactivación viral a pH bajo, filtración en profundidad, cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de intercambio de aniones, nanofiltración y ultra/diafiltración de 30 kD (Shukla et al., 2007).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo según se describe arriba para uso en medicina.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene, como ingrediente activo, una molécula de anticuerpo anti-IGF, preferiblemente un anticuerpo completo, de la invención.

Para ser usado en terapia, la molécula de anticuerpo anti-IGF se incluye en composiciones farmacéuticas apropiadas para facilitar la administración a animales o a seres humanos. Pueden prepararse formulaciones típicas de la molécula de anticuerpo anti-IGF mezclando la molécula de anticuerpo anti-IGF con vehículos, excipientes o agentes estabilizantes fisiológicamente aceptables, en forma de formulaciones liofilizadas o secadas de cualquier otra forma, o soluciones acuosas o suspensiones acuosas o no acuosas. Los vehículos, excipientes, agentes modificadores o agentes estabilizantes no son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Incluyen sistemas tampón tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos o inorgánicos y sus sales; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; agentes conservantes tales como cloruro de octadecildimetilbencil-amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil-parabenos tales como metil- o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, sacarosa, trehalosa, dextrinas o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcoholes tales como manitol o sorbitol; iones conjugados formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos iónicos o no iónicos tales como TWEEN™ (polisorbatos), PLURONICS™ o ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos o ésteres de azúcares. En la formulación del anticuerpo también pueden estar contenidos disolventes orgánicos tales como etanol o isopropanol. Los excipientes también pueden tener una función modificadora de la liberación o de la absorción.

Las moléculas del anticuerpo anti-IGF también pueden secarse (por liofilización, atomización, liofilización por pulverización, secarse mediante gases supercríticos o casi supercríticos, secarse a vacío o secarse con aire), precipitarse o cristalizarse u ocluirse en microcápsulas que, por ejemplo, se preparan por técnicas de coacervación técnicas o por polimerización interfacial usando, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o gelatina y poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), en macroemulsiones o precipitarse o inmovilizarse sobre vehículos o superficies, por ejemplo mediante la tecnología pcmc (microcristales revestidos con proteínas). Tales técnicas se describen en Remington, 2005.

Naturalmente, las formulaciones para ser usadas para la administración *in vivo* tienen que ser estériles; la esterilización puede conseguirse mediante técnicas convencionales, p. ej. por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Puede ser útil aumentar la concentración del anticuerpo anti-IGF para llegar a una formulación líquida denominada de alta concentración (HCLF); para generar tales HCLFs se han descrito varias formas.

La molécula de anticuerpo anti-IGF también puede estar contenida en una preparación de liberación sostenida. Tales preparaciones incluyen matrices sólidas, semisólidas o líquidas de polímeros hidrófobos o hidrófilos, y pueden estar en forma de artículos conformados, p. ej., películas, barras o microcápsulas, y pueden aplicarse vía un dispositivo de aplicación. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo o acetato-butilato de sacarosa), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando están encapsulados, los anticuerpos permanecen en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de

actividad biológica y a posibles cambios en la inmunogenicidad. Dependiendo del mecanismo implicado pueden idearse estrategias racionales para la estabilización. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares por medio del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilización (p. ej., como se describe en el documento WO 89/011297) en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices polímeras específicas.

En los documentos US 7.060.268 y US 6.991.790 se describen formulaciones que también pueden usarse para la molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención.

La molécula de anticuerpo IGF también puede incorporarse en otras formas de aplicación tales como dispersiones, suspensiones o liposomas, comprimidos, cápsulas, polvos, pulverizaciones, parches transdérmicos o intradérmicos, o cremas con o sin dispositivos que potencien la permeación, obleas, formulaciones nasales, bucales o pulmonares, o pueden producirse mediante células implantadas o - después de terapia génica - mediante las propias células del individuo.

Una molécula de anticuerpo anti-IGF también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, p. ej., para aumentar la semivida en el suero o para aumentar la unión en los tejidos.

El modo preferido de aplicación es parenteral, por infusión o inyección (intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica), pero también pueden ser aplicables otros modos de aplicación tales como por inhalación, transdérmico, intranasal, bucal u oral.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención contiene el anticuerpo anti-IGF, p. ej., el anticuerpo 60833, en una concentración de 10 mg/ml y, además, comprende citrato de Na 25 mM a pH 6, NaCl 115 mM, Tween® (polisorbato 20) al 0,02 %.

En otra realización, la composición farmacéutica de la invención es una solución acuosa que contiene el anticuerpo anti-IGF, p. ej., el anticuerpo 60833, en una concentración de 10 mg/ml, y que comprende, además, histidina HCl 25 mM pH 6, 38,8 g/L de manitol, 9,70 g/L de sacarosa y Tween® (polisorbato 20) al 0,02%.

Para la infusión intravenosa, la composición farmacéutica de la invención puede ser diluida con una solución fisiológica, p. ej. con cloruro de sodio al 0,9 % o solución G5.

La composición farmacéutica puede estar liofilizada y reconstituirse con agua para inyección (API) antes del uso.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y de la discreción del médico que atiende. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial para administrar al paciente es aproximadamente 1 µg/kg a 20 mg/kg (por ejemplo, 0,1 - 15 mg/kg) de anticuerpo, por ejemplo mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua, p. ej., infusión a lo largo de 1 hora. Un programa de tratamiento típico implica, usualmente, la administración del anticuerpo una vez a la semana a una vez cada tres semanas, con dosis que oscilan entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aprox. 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Por ejemplo, una dosis semanal podría ser 5, 10 ó 15 mg/kg. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo a ser administrada será la mínima cantidad necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno.

La molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención y las composiciones farmacéuticas que la contienen son útiles para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos.

En ciertas realizaciones, el trastorno hiperproliferativo es cáncer.

Los cánceres se clasifican de dos formas: por el tipo de tejido en el cual se origina el cáncer (tipo histológico) y por el sitio primario, o la localización en el cuerpo, en el que primero se desarrolla el cáncer. Los sitios más comunes en los que se desarrolla el cáncer incluyen la piel, el pulmón, la mama, la próstata, el colon y el recto, el cuello uterino y el útero.

Las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención son útiles en el tratamiento de una diversidad de cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

- cáncer relacionado con el SIDA, tal como el sarcoma de Kaposi;
- cánceres relacionados con los huesos, tales como la familia de tumores de Ewing y el osteosarcoma;
- cánceres relacionados con el cerebro, tales como el tumor cerebral en los adultos, glioma del tallo encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil/glioma maligno, ependimoma infantil, meduloblastoma infantil, tumores neuroectodérmicos supratentoriales infantiles, glioma hipotalámico y óptico infantil y otros tumores cerebrales infantiles;
- cáncer de mama;
- cánceres relacionados con el tracto digestivo/gastrointestinal, tales como el cáncer anal, cáncer del conducto biliar extrahepático, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de estroma gastrointestinal (GIST), colangiocarcinoma, cáncer de colon, cáncer esofágico, cáncer de la vesícula biliar, cáncer primario de hígado en los adultos (carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma), cáncer de hígado infantil, cáncer de páncreas, cáncer rectal, cáncer del intestino delgado y cáncer de estómago (gástrico);
- cánceres relacionados con el sistema endocrino, tales como el carcinoma adrenocortical, tumor carcinoide gastrointestinal, carcinoma de los islotes celulares (páncreas endocrino), cáncer de paratiroides, feocromocitoma, tumor de la pituitaria y cáncer de tiroides;
- cánceres relacionados con los ojos tales como el melanoma intraocular y el retinoblastoma;
- cánceres relacionados con el sistema genitourinario tales como el cáncer de vejiga, cáncer de riñón (células renales), cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer de células transicionales de la pelvis renal o del uréter, cáncer de los testículos, cáncer de la uretra, tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles;
- cánceres relacionados con las células germinales tales como el tumor extracraneal de células germinales infantiles, tumor extragonadal de células germinales, tumor de células germinales de los ovarios y cáncer de los testículos;
- cánceres ginecológicos tales como el cáncer cervical, cáncer del endometrio, tumor trofoblástico gestacional, cáncer epitelial de los ovarios, tumor de las células germinales de los ovarios, tumor de ovario de bajo potencial maligno, sarcoma uterino, cáncer vaginal y cáncer de la vulva;
- cánceres relacionados con el cuello y la cabeza tales como el cáncer hipofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer escamoso metastásico del cuello con tumor primario oculto, cáncer nasofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer del paratiroides y cáncer de las glándulas salivares;
- cánceres relacionados con el sistema hematológico/sanguíneo tales como las leucemias, tales como la leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda en adultos, leucemia mieloide aguda infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de las células pilosas; y linfomas, tales como el linfoma relacionado con el SIDA, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin en adultos, linfoma de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin durante el embarazo, micosis fungoides, linfoma no de Hodgkin en adultos, linfoma no de Hodgkin infantil, linfoma no de Hodgkin durante el embarazo, linfoma primario del sistema nervioso central, síndrome de Sezary, linfoma cutáneo de células T y macroglobulinemia de Waldenström y otros cánceres relacionados con el sistema hematológico/sanguíneo, tales como los trastornos mieloproliferativos crónicos, neoplasma de mieloma múltiple/células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos y enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas;
- cánceres relacionados con el sistema músculoesquelético, tales como la familia de tumores de Ewing, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno de huesos, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de tejido blando en adultos, sarcoma de tejido blando infantil y sarcoma uterino; hemangiosarcomas y angiosarcoma;
- cánceres relacionados con el sistema neurológico, tales como el tumor cerebral en adultos, tumor cerebral infantil, glioma del tallo encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos supratentoriales primitivos, glioma óptico e hipotalámico y otros tumores cerebrales tales como neuroblastoma, tumor de la pituitaria y linfoma primario del sistema nervioso central;
- cánceres relacionados con el sistema respiratorio/torácico tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno, timoma y carcinoma tímico;
- cánceres relacionados con la piel tales como el linfoma cutáneo de células T, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoma de células de Merkel y cáncer de piel;

- tumores de células redondas azules pequeñas.

En particular, las moléculas de anticuerpo anti-IGF de la invención y las composiciones farmacéuticas que las contienen son beneficiosas en el tratamiento de cánceres del sistema hematopoyético que incluyen leucemias, linfomas y mielomas, cánceres del tracto gastrointestinal que incluyen el cáncer esofágico, gástrico, colorrectal, pancreático, de hígado y de la vesícula biliar y del conducto biliar; cáncer de riñón, de próstata y de vejiga; cánceres ginecológicos que incluyen el cáncer de mama, de ovarios, cervical y de endometrio; cánceres de piel, cabeza y cuello que incluyen los melanomas malignos; cánceres pediátricos, tales como el tumor de Wilms, el neuroblastoma y el sarcoma de Ewing; cánceres de cerebro como el glioblastoma; sarcomas, tales como el osteosarcoma, el sarcoma de tejido blando, el rabdomiosarcoma, el hemangiosarcoma; el cáncer de pulmón, el mesotelioma y el cáncer de tiroides.

En un aspecto preferido de la invención, las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención y composiciones farmacéuticas que contienen a las mismas son beneficiosas en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular NSCLC localmente avanzado o metastásico (fase IIIB/IV). En este contexto, las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención se pueden combinar con quimioterapia basada en platino, en particular terapia doble con platino paclitaxel/carboplatino o gemcitabina/cisplatino.

En un aspecto adicional preferido de la invención, las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención y composiciones farmacéuticas que contienen a las mismas son beneficiosas en el tratamiento de carcinoma hepatocelular, en particular carcinoma localmente avanzado o hepatocelular (fase III/IV). En este contexto, las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención pueden combinarse con sorafenib (Strumberg D., 2005).

En otra realización, las moléculas de anticuerpo anti-IGF y las composiciones farmacéuticas que las contienen son útiles en los trastornos hiperproliferativos no cancerosos tales como, sin límites, la psoriasis y la restenosis después de angioplastia. Además, basado en la reciente observación (Reinberg, 2008) de que una mutación genética que disminuye la actividad de IGF-1 tiene un efecto positivo sobre la longevidad, los anticuerpos de la invención tienen el potencial de ser útiles, cuando se aplican a adultos, en terapias para ralentizar el envejecimiento y en enfermedades relacionadas con la prevención del envejecimiento.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una molécula de anticuerpo según se describe antes para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cancerosa esbozada anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según se describe antes para el tratamiento de una enfermedad cancerosa esbozada anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad cancerosa según se ha esbozado anteriormente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica según se describe en esta memoria.

Dependiendo del trastorno a ser tratado, la molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención puede usarse por sí misma o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en particular seleccionados de agentes que dañan al ADN o de compuestos terapéuticamente activos que inhiben la angiogénesis, las rutas de transducción de señales o los puntos de control mitóticos en células cancerosas.

El agente terapéutico adicional puede administrarse simultáneamente con, opcionalmente como un componente de la misma preparación farmacéutica, o antes o después de la administración de la molécula de anticuerpo anti-IGF.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser, sin límites, uno o más agentes inhibidores seleccionados del grupo de agentes inhibidores de EGFR, VEGFR, HER2-neu, AuroraA, AuroraB, PLK y PI3 quinasa, FGFR, PDGFR, Raf, KSP o PDK1.

Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos adicionales son los agentes inhibidores de CDK, Akt, src/bcr-abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, agentes antagonistas hedgehog, agentes inhibidores de JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, el proteasoma, Rho, un agente inhibidor de la transmisión de señales wnt o un agente inhibidor de la ruta de ubiquitinación.

Ejemplos de inhibidores de Aurora son, sin limitación, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 y ENMD-2076.

Un ejemplo de un agente inhibidor de PLK es GSK-461364.

Ejemplos de agentes inhibidores de raf son BAY-73-4506 (también un agente inhibidor de VEGFR), PLX-4032, RAF-265 (también un agente inhibidor VEGFR), sorafenib (también un agente inhibidor de VEGFR), XL-281 y Nevavar (también un agente inhibidor de VEGFR).

Ejemplos de agentes inhibidores de KSP son ispinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355 y EMD-534085.

- 5 Ejemplos de agentes inhibidores de src y/o bcr-abl son dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL-228 (también un agente inhibidor de IGF-1R), nilotinib (también un agente inhibidor de PDGFR y de cKit), imatinib (también un agente inhibidor de cKit), NS-187, KX2-391, AP-24534 (también un agente inhibidor de EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 y LS-104 (también un agente inhibidor de Flt3, Jak2).

Un ejemplo de un agente inhibidor de PDK1 es AR-12.

Un ejemplo de un agente inhibidor de Rho es BA-210.

- 10 Ejemplos de agentes inhibidores de PI3 quinasa son PX-866, PX-867, BEZ-235 (también un agente inhibidor de mTor), XL-147, XL-765 (también un agente inhibidor de mTor), BGT-226, CDC-0941, GSK-1059615.

Ejemplos de agentes inhibidores de cMet o de HGF son XL-184 (también un agente inhibidor de VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (también un agente inhibidor de VEGFR), MGCD-265 (también un agente inhibidor de VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMab, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060 y E-7050.

- 15 Un ejemplo de un agente inhibidor de c-Myc es CX-3543.

- 20 Ejemplos de agentes inhibidores de Flt3 son AC-220 (también un agente inhibidor de cKit y PDGFR), KW-2449, LS-104 (también un agente inhibidor de bcr-abl y Jak2), MC-2002, SB-1317, lestaurtinib (también un agente inhibidor de VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (también un agente inhibidor de JAK2), XL-999 (también un agente inhibidor de cKit, FGFR, PDGFR y VEGFR), sunitinib (también un agente inhibidor de PDGFR, VEGFR y cKit), y tandutinib (también un agente inhibidor de PDGFR, y cKit).

Ejemplos de agentes inhibidores de HSP90 son tanespimicina, alvespimicina, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024 y SNX-5422.

Ejemplos de agentes inhibidores de JAK/STAT son CYT-997 (que también interactúa con tubulina), TG-101348 (también un agente inhibidor de Flt3), y XL-019.

- 25 Ejemplos de agentes inhibidores de Mek son ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119 y XL-518.

Ejemplos de agentes inhibidores de mTor son rapamicina, temsirolimus, deforolimus (que también actúa como un agente inhibidor de VEGF), everolimus (además un agente inhibidor de VEGF), XL-765 (también un agente inhibidor de PI3 quinasa) y BEZ-235 (también un agente inhibidor de PI3 quinasa).

- 30 Ejemplos de agentes inhibidores de Akt son perifosina, GSK-690693, RX-0201, y triciribina.

- 35 Ejemplos de agentes inhibidores de cKit son masitinib, OSI-930 (también actúa como un agente inhibidor de VEGFR), AC-220 (también un agente inhibidor de Flt3 y PDGFR), tandutinib (también un agente inhibidor de Flt3 y PDGFR), axitinib (también un agente inhibidor de VEGFR y PDGFR), sunitinib (también un agente inhibidor de Flt3, PDGFR, VEGFR) y XL-820 (también actúa como un agente inhibidor de VEGFR y PDGFR), imatinib (también un agente inhibidor de bcr-abl), nilotinib (también un agente inhibidor de bcr-abl y PDGFR).

Ejemplos de antagonistas hedgehog son IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926 y XL-139.

Ejemplos de agentes inhibidores de CDK son seliciclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (que también inhibe a VEGFR2 y PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-848125 y SCH-727965.

- 40 Ejemplos de inhibidores de proteasoma/inhibidores de la vía de NFkappaB son bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680 y SPC-839.

Un ejemplo de un agente inhibidor de la vía de ubiquitinación es HBX-41108.

- 45 Ejemplos de agentes anti-angiogénicos son los agentes inhibidores de FGFR, PDGFR y VEGF(R), y las talidomidas, seleccionándose tales agentes de, sin limitación, BIBF 1120 (Vargatef®), bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (también un agente inhibidor de CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs, talidomida, CC-4047, lenalidomida, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, cediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (también un agente inhibidor de Flt3), sunitinib (también un agente inhibidor de cKit y Flt3), axitinib (también un agente inhibidor de cKit), lestaurtinib (también un agente inhibidor de Flt3 y PKC), vatalanib, tandutinib (también un agente inhibidor de Flt3 y cKit), pazopanib, aflibercept, E-7080, CHIR-258, tosilato de sorafenib (también un agente inhibidor de Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (también un agente inhibidor de EGFR y Her2), BAY-57-9352 (también un agente inhibidor de Raf), BAY-73-4506 (también un agente inhibidor de Raf), XL-880 (también un agente inhibidor de cMet), XL-647 (también un agente inhibidor de EGFR y
- 50

EphB4), XL-820 (también un agente inhibidor de cKit), nilotinib (también un agente inhibidor de cKit y bcr-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401 y ENMD-2976.

El agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de agentes inhibidores de EGFR, puede ser un agente inhibidor de EGFR de moléculas pequeñas o un anticuerpo anti-EGFR. Ejemplos de anticuerpos anti-EGFR, sin límites, son cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; ejemplos de inhibidores de EGFR de moléculas pequeñas son gefitinib, erlotinib y vandetanib (también un agente inhibidor del VEGFR). Otro ejemplo de un agente modulador de EGFR es la toxina de fusión EGF.

Agentes inhibidores de EGFR y/o Her2 adicionales, útiles para su combinación con una molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención, son BIBW 2992 (Tovok®), lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (también un agente inhibidor de VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769.

Otros agentes que se pueden combinar ventajosamente en una terapia con la molécula de anticuerpo anti-IGF de la invención son tositumumab e ibritumomab tiuxetan (dos anticuerpos anti-CD20 radiomarcados); ofatumumab, rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, TRU-015, PRO-131921, FBT-A05, veltuzumab, R-7159 (agentes inhibidores de CD20), alemtuzumab (un anticuerpo anti-CD52), denosumab, (un agente inhibidor del ligando del factor de diferenciación de osteoclastos), galiximab (un antagonista de CD80), zanolimumab (un antagonista de CD4), SGN40 (un modulador del receptor del ligando CD40), XmAb-5485, Chi Lob 7/4, lucatumumab, CP-870893 (agentes inhibidores de CD40), CAT-8015, epratuzumab, Y90-epratuzumab, inotuzumab ozogamicin (agentes inhibidores de CD22), lumiliximab (un agente inhibidor de CD23), TRU-016 (un agente inhibidor de CD37), MDX-1342, SAR-3419, MT-103 (agentes inhibidores de CD19), o mapatumumab, tigatuzumab, lexatumumab, Apomab, AMG-951 y AMG-655 (moduladores del receptor TRAIL).

Otros fármacos quimioterapéuticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de anticuerpo anti-IGF de la presente invención se seleccionan de, pero no se limitan a, hormonas, análogos hormonales y antihormonales (p. ej., tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, fulvestrant, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, finasterida, acetato de buserelina, fludrocortisona, fluoximesterona, medroxiprogesterona, octreotida, arzoxifeno, pasireotida, vapreotida), agentes inhibidores de aromataza (p. ej., anastrozol, letrozol, liarozol, exemestano, atamestano, formestano), agentes agonistas y agentes antagonistas de LHRH (p. ej., acetato de goserelina, leuprolida, abarelix, cetrorelix, desloreline, histrelina, triptorelina), antimetabolitos (p. ej., antifolatos tales como metotrexato, pemetrexed, análogos de la pirimidina tales como 5-fluorouracilo, capecitabina, decitabina, nelarabina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina tales como mercaptopurina tioguanina, cladribina y pentostatina, citarabina, fludarabina); antibióticos antitumorales (p. ej., antraciclinas tales como doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idarubicina, mitomicina-C, bleomicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, pixantrona, estreptozocina); derivados del platino (p. ej., cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, lobaplatino, satraplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, mecloretamina, melfalano, clorambucilo, busulfano, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, hidroxiaurea, temozolomida, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimetabólicos (p. ej., alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina y vincristina; y taxanos tales como paclitaxel, docetaxel y sus formulaciones, larotaxel; simotaxel, y epotilonas tales como ixabepilona, patupilona, ZK-EPO); agentes inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., epipodofilotoxinas tales como etopósido y etopofos, teniposida, amsacrina, topotecan, irinotecan) y agentes quimioterapéuticos varios tales como amifostina, anagrelida, interferón alfa, procarbazona, mitotano, y porfimer, bexaroteno, celecoxib.

En un aspecto, las moléculas de anticuerpos anti-IGF de la invención se utilizan en combinación con quimioterapia basada en platino, por ejemplo en combinación con terapia doble con platino paclitaxel/carboplatino o gemcitabina/cisplatino. En una realización, esta terapia de combinación puede repetirse varias veces, por ejemplo 6 ciclos (cada 3 semanas). Este tratamiento puede ser seguido por tratamiento repetido adicional (p. ej. 6 ciclos cada 3 semanas) con una molécula de anticuerpo anti-IGF sola. Este régimen se puede utilizar, p. ej., en el tratamiento de NSCLC. En otro aspecto, las moléculas de anticuerpo anti-IGF de la invención se utilizan en combinación con sorafenib. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-IGF se puede administrar repetidamente a intervalos de 1-3 semanas, p. ej. durante 12 ciclos, en combinación con la administración continua de sorafenib. Este régimen se puede utilizar, p. ej., en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

Las moléculas de anticuerpo anti-IGF de la invención, p. ej., cuando se utilizan a concentraciones bajas, también se pueden combinar con agentes que tienen como diana el IGF-1R. Tales agentes incluyen anticuerpos que se unen a IGF-1R (p. ej., CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, B1B-022, SCH-717454, rhu Mab IGF1R y nuevas entidades químicas que tienen como diana el dominio quinasa del IGF1-R (p. ej., OSI-906 o BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Las moléculas de anticuerpo anti-IGF de la invención también se pueden utilizar en combinación con otras terapias, incluidas la cirugía, radioterapia, terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica, hipertermia y crioterapia y agentes para atenuar cualquier efecto adverso, p. ej., antieméticos y, en una realización preferida, antidiabéticos, p. ej., metformina.

Las moléculas de anticuerpo anti-IGF de la invención también son útiles en el diagnóstico de cánceres en los que los elevados niveles de IGF-1 y/o IGF-2 en el suero se correlacionan con el desarrollo o la progresión de la enfermedad, p. ej., para determinar elevados niveles de IGF-2 debido a la pérdida de sellado (LOI), una alteración epigenética que afecta al gen del factor de crecimiento insulínico II (*IGF2*). En ciertas realizaciones, un anticuerpo para aplicaciones de diagnóstico, p. ej., para la detección de IGF-1 en secciones de tejidos de ser humano por tinción inmunohistológica, es un anticuerpo quimera que se deriva de un anticuerpo de ser humano. En un anticuerpo de este tipo, las regiones constantes, o sus partes, han sido reemplazadas por las respectivas secuencias de un anticuerpo de otra especie, por ejemplo ratón. Usando un anticuerpo quimera de este tipo como un anticuerpo principal, el anticuerpo secundario, por ejemplo un anticuerpo de cabra que reacciona específicamente con la porción Fc murina, reconocerá específicamente las secuencias murinas del anticuerpo quimera principal y no se unirá a las porciones Fc de las otras moléculas de inmunoglobulinas de ser humano que están presentes en la muestra de tejido de ser humano. Así, se evita la tinción no deseada del fondo.

Los anticuerpos de la invención, al bloquear la transducción de señales mediada por IGF-1 e IGF-2, también pueden ser útiles para el control del peso corporal y la formación de tejido adiposo. Para este fin, los anticuerpos de la invención se administran solos o en combinación con otros fármacos anti-obesidad.

Materiales y métodos

Selección de anticuerpos completamente humanos, de alta afinidad, que se unen a IGF-1

La selección de clones de fragmentos Fab específicos a partir de la genoteca de anticuerpos combinatorios humanos (HuCAL Gold) (Knappik et al., 2000) que se unen a IGF-1 humano con afinidad baja nanomolar se realiza esencialmente como se describe por Rauchenberger et al., 2003, en tres ciclos de adsorción. Con el fin de identificar fragmentos Fab con afinidad mejorada por IGF-1 humano, varios de estos clones Fab 'parentales' se someten a una 'maduración de la afinidad *in vitro*', esencialmente según se describe por Nagy et al., 2002. Las secuencias L-CDR3 (CDR3 de cadena ligera) y H-CDR2 (CDR2 de cadena pesada) de cada clon se diversifican por separado, sustituyendo la secuencia parental por aproximadamente 10⁶ casetes L-CDR3 y H-CDR2 de HuCAL (Knappik et al., 2000). Se preparan fagos a partir de las 'genotecas de maduración' resultantes, y cada genoteca se somete a adsorciones en solución en IGF-1 humano. Con el fin de seleccionar los ligantes de IGF-1 humano de más alta afinidad, las adsorciones en solución se realizan en condiciones de lavado normales y de rigurosidad incrementada de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, con reducción de antígeno, y con y sin el bloqueo de la insulina humana. Los resultados de la adsorción, tras tres rondas de adsorción del fago, se subclonan en un vector de expresión de Fab, y la afinidad de cada Fab por el IGF-1 humano se determina mediante una tecnología de titulación en equilibrio basada en electroquimioluminiscencia, desarrollada por BioVeris (Witney, Oxfordshire, GB), esencialmente como se describe por Haenel et al., 2005. Los clones Fab con las mejores afinidades por IGF-1 se secuencian, y luego se convierten en anticuerpos IgG1 humanos según se describe por Krebs et al., 2001, con una afinidad subnanomolar por IGF-1 humano, sin ningún cambio en la especificidad, en comparación con los anticuerpos parentales.

Clonación y expresión recombinante de anticuerpos de IgG1

Regiones de cadena pesada variables (VH) y regiones de cadena ligera variables (VL) se escinden de los vectores de expresión de Fab mediante digestión con enzimas de restricción y se ligan en sitios de enzimas de restricción compatibles de plásmidos basados en pcDNA3.1 que contienen las regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 humana y de la cadena ligera de Igλ humana, respectivamente. Se preparan preparaciones de plásmidos EndoFree (Qiagen) y los plásmidos de las cadenas pesada y ligera se co-transfectan en células freestyle HEK293 (Invitrogen) a una concentración de cada plásmido de 1 mg/L según el protocolo del proveedor. Después de 72 horas se cosecha el sobrenadante y la concentración de IgG se determina mediante ensayo ELISA. El anticuerpo se purifica en una columna modificada con proteína A (GE Healthcare), se eluye en tampón citrato y, a continuación, se dializa hasta una concentración de 2,5 mg/ml en PBS. Alternativamente, se genera una línea de células CHO establemente integrada con los plásmidos de expresión de anticuerpos y se utilizan para producir los anticuerpos.

Análisis de la resonancia por plasmón de superficie para determinar constantes de afinidad

a) Método de captura del anticuerpo

El chip sensor se reviste con aproximadamente 1000 UR del anticuerpo de referencia en células de flujo 1 y con aproximadamente 1000 UR de un anticuerpo específico para Fc-gamma, anti-humano de conejo en células de flujo 2 utilizando los reactivos de acoplamiento de un kit de acoplamiento de aminos. Se establece una diana de 1000 UR en el kit wizard de la preparación en superficie del software Biacore 3000 a un caudal de 5 µl/min. El tampón de ejecución utilizado es HBS-EP. Las mediciones de afinidad se realizan utilizando los siguientes parámetros: caudal de 20 µl/min (tampón de ejecución HCB); temperatura de detección, 25°C; vías de flujo Fc1, Fc2; detección de Fc1, Fc2; captura de MAbhu anti-IGF: 3 min de una solución de 1 µg/ml; asociación de IGF-Ag durante 5 min; disociación de IGF-Ag durante 5 min; regeneración: pulso durante 30 s con HCl 50 mM. Los antígenos de IGF se diluyen hasta 500, 250, 125, 62,5 y 31,3 nM en tampón de ejecución (HCB) y las diferentes diluciones de antígeno se realizan de forma única sobre Fc1 y Fc2 con un orden aleatorio. Tandas en blanco utilizando tampón de ejecución sólo se

realizan entremedias. Una curva de tanda en blanco se sustrae de cada curva de unión antes del análisis de afinidad. La evaluación de los datos se realiza utilizando el software BIAevaluation (versión 4.1, Biacore, Freiburg, Alemania). Las fases de disociación y de asociación de las cinéticas se ajustan por separado. Para el ajuste separado de los valores k_{diss} se utiliza un marco de tiempo de los 200 - 300 segundos iniciales en la fase de disociación (intervalo de disminución estacionaria de la señal). Para el ajuste separado de los valores k_{ass} se utilizan marcos de tiempo de aproximadamente 100 segundos (intervalo de aumento estacionario de la señal), y para el cálculo de los valores k_{diss} individuales con el modelo de asociación 1:1 de Langmuir. Se calculan los valores medios con las desviaciones estándares de los datos cinéticos junto con las correspondientes constantes de disociación (K_D) y de asociación (K_A).

10 b) Método de revestimiento con IGF

La determinación de las constantes de unión de anticuerpos IGF a ligandos de IGF, cuando el chip del sensor está revestido con ligandos de IGF, se realiza según se describe antes, excepto que el chip del sensor está revestido con 35,1 pg/mm² y 38,5 pg/mm² de IGF-1 e IGF-2, respectivamente. Los anticuerpos se hacen fluir luego sobre el chip a las concentraciones siguientes: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 nM.

15 Medición de la unión a IGFs humanos, murinos y de rata y a insulina humana en ensayos de inmovilizado

Anticuerpos IgG1 completamente humanos que se unen con una elevada afinidad a IGF-1 se testan también en cuanto a la unión a IGF-1 humano en ensayos de inmovilizado directos (ELISA). Los ensayos se realizan revistiendo IGF-1 humano (R&D Systems, N° 291-G1) a placas Maxisorb de 96 pocillos a una concentración de 0,5 µg/ml durante una noche a 4°C (100 µl/pocillo). Tampón de revestimiento solo se utiliza como un control para la unión no específica. Los pocillos se lavan entonces una vez con tampón de lavado (1 x TBS-T) y los sitios de unión residuales se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo durante 1 hora a la temperatura ambiente en un sacudidor orbital, seguido de un ciclo de lavado adicional. Sobre las placas revestidas se preparan directamente diluciones triples en serie de cada anticuerpo de ensayo. Concentraciones típicas utilizadas son 50, 16,6, 5,6, 1,8, 0,6, 0,2 y 0,07 ng/ml. Tampón de bloqueo solo se utiliza como un control positivo. Las placas se incuban entonces durante 2 horas a la temperatura ambiente con agitación. Después de tres ciclos de lavado de 100 µl/pocillo de reactivo secundario de IgG anti-humana conjugada con HRPO, se añade a todos los pocillos de reactivo secundario (Jackson ImmunoResearch Inc.) diluido en tampón de bloqueo. Después de 2 horas de incubación a la temperatura ambiente con agitación, las placas se lavan tres veces y en todos los pocillos se pipetea 100 µl/pocillo de solución de sustrato TMB (cantidades iguales de solución A y B). Las placas se incuban durante 10-20 min a TA con agitación y, luego, la reacción se detiene mediante la adición de 100 µl/pocillo de ácido fosfórico 1 M. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 450 nm (referencia 650 nm).

La unión de los anticuerpos IgG1 de unión a IGF-1 completamente humano a IGF-1 de ratón (R&D Systems, N° 791-MG), IGF-1 de rata (IBT, N° RU100), IGF-2 humano (GroPep, N° FM001), IGF-2 de ratón (R&D Systems, N° 792-MG), IGF-2 de rata IGF-2 (IBT, N° AAU100) e insulina humana (Roche) también se testa según se describe antes para IGF-1 humano (excepto que la concentración de insulina humana utilizada para el revestimiento es 3 µg/ml).

Ensayos de proliferación celular *in vitro* para determinar la potencia de neutralización

La línea de células de cáncer de mama MCF-7 (ATCC, HTB-22) y la línea de células derivada de cáncer de colon COLO 205 (ATCC n° CCL-222) se extienden en placas de 96 pocillos a una densidad de células de 1000 células por pocillo en medio RPMI exento de suero. Se añaden 10 ng/ml de IGF-1 o IGF-2 en presencia o ausencia de un anticuerpo control de isotipo humanizado que no se une a IGF-1 o IGF-2, o de anticuerpos 60814, 60819 y 60833, a concentraciones de 12, 37, 111, 333, 1000 y 3000 ng/ml. Las células se cultivan durante 5 días y a continuación se determina el número relativo de células en cada pocillo usando el ensayo luminiscente CellTiter-Glo de viabilidad celular (Promega). La luminiscencia (UL = unidades de luminiscencia) se registra utilizando un XFluor GENios Pro 4.

Ensayo de crecimiento de línea de células derivada de sarcoma de Ewing

Las líneas de células TC-71 (ATCC n° ACC516) y SK-ES-1 (ATCC n° HTB86) derivados de sarcoma de Ewing se distribuyen en placas de 96-pocillos con una densidad de 1000 células por pocillo en medio DMEM que contiene 1 x NEAA, 1 x piruvato de sodio, 1x glutamax y suero de ternero fetal (FCS) al 10% y se incuban durante toda la noche a 37°C y en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Al día siguiente se añadió a las células una dilución en serie de anticuerpo de ensayo, anticuerpo control de isotipo humanizado (un anticuerpo IgG1 humanizado que tiene como diana CD44-v6) el cual no se une a IGF-1 o IGF-2, rapamicina, o una combinación de rapamicina y anticuerpo de ensayo. Las concentraciones típicas utilizadas son 30, 10, 3,3, 1,1, 0,37 y 0,12 µg/ml (ó 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 nM de rapamicina y anticuerpo de ensayo para estudios de combinación) y cada dilución se realiza en pocillos por triplicado. Las células más el anticuerpo se incuban a continuación durante 120 horas, tiempo después del cual se determina el número relativo de células en cada pocillo usando el ensayo luminiscente CellTiter-Glo de viabilidad celular (Promega). La luminiscencia (UL = unidades de luminiscencia) se registra usando un programa informático XFluor GENios Pro 4 y para el análisis de datos se toma el valor medio de tres pocillos triplicados y se ajusta mediante cálculos iterativos usando un programa de análisis de curvas sigmoidales (Graph Pad Prism) con pendiente variable de Hill.

Análisis de transferencia Western de niveles de AKT y PTEN fosforilados

Células SK-ES-1 se extienden en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero de bovino fetal al 10 % y, después de incubación durante una noche, se tratan con 100 nM de anticuerpo control de isótopo (un anticuerpo IgG1 humanizado que tiene como diana CD44-v6) el cual no se une a IGF-1 o IGF-2, 100 nM de 60819, 100 nM de rapamicina, o una combinación de 100 nM de 60819 y 100 nM de rapamicina. 24 horas más tarde, las células se lisan y el lisado de células se congela después de haber determinado la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford. La transferencia Western se realiza aplicando 30 µg de lisados de proteínas a un gel SDS PAGE (BioRad) y el gel se mancha sobre un emparejado Citerian para manchar geles. Los borrones Western se incuban durante una noche con un anticuerpo (control) de actina anti-beta de conejo, un anticuerpo anti-PTEN de conejo (Cell Signaling nº 9559), o un anticuerpo anti-fosfo-pAKT de conejo (Cell Signaling nº 4060), a diluciones de 1:5000 (actina anti-beta), 1:1000 (anti-PTEN) ó 1:2000 (anti-fosfoAKT) en 1 % de polvo de leche. Tras el lavado se aplica un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRPO (Amersham) durante 1 hora y después de más lavados en TBS se detecta la reactividad del anticuerpo por ECL y se captura sobre Hyperfilm (Amersham).

Combinación *in vitro* de anticuerpo anti-IGF con inhibidor de EGFR en la línea de células derivada de NSCLC

La línea de células A-549, derivada de NSCLC (ATCC nº CCL-185) se extiende en placas de 96 pocillos a una densidad de 1000 células por pocillo en medio RPMI 1640 que contiene 2 mM de L-glutamina y suero de bovino fetal al 10% y se incuba durante una noche a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. Al día siguiente se añade a las células una dilución en serie de anticuerpo de IGF de ensayo, erlotinib/Tarceva, o una combinación de anticuerpo de IGF de ensayo y erlotinib. Las concentraciones típicas del anticuerpo de IGF de ensayo utilizadas son 30000, 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 14 ng/mL, y las concentraciones típicas de erlotinib utilizadas son 20000, 6667, 2222, 741, 247, 82, 27, 9 nM, y cada una de las diluciones se realiza en pocillos por triplicado. Las células se incuban a continuación durante 120 horas, tiempo después del cual se determina el número relativo de células en cada pocillo usando el ensayo luminiscente CellTiter-Glo de viabilidad celular (Promega). La luminiscencia (UL = unidades de luminiscencia) se registra usando un programa informático XFluor GENios Pro 4 y para el análisis de datos se toma el valor medio de tres pocillos triplicados y se ajusta mediante cálculos iterativos usando un programa de análisis de curvas sigmoidales (Graph Pad Prism) con pendiente variable de Hill.

Determinación del efecto sobre las concentraciones totales de IGF-1 murino y totales de rata en suero

Se dan administraciones únicas intravenosas (bolo) de 25, 12,5, 6,25 y 3,13 mg/kg de anticuerpo de ensayo IGF a ratones hembra atímicos NMRI, de 6-8 semanas de edad (n = 5). Se dan administraciones únicas intravenosas durante 10 minutos de 30, 100, 200 mg/kg de anticuerpo 60819 a ratas Wistar Han machos y hembras, de 6-8 semanas de edad (n = 4 machos, 4 hembras). Antes del tratamiento con el anticuerpo y 24 horas después de la administración se extrae una muestra de sangre, se recoge suero, y se determinan las concentraciones totales de IGF-1 murino o de rata usando el ensayo inmunocitométrico OCEIA de IGF-1 total de rata/ratón. El ensayo se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante, la absorbancia se mide a 450 nm y se evalúa usando el software SoftMax Pro. Para determinar la concentración en suero de IGF-1 total en ng/mL se usa una curva patrón. El análisis estadístico se lleva a cabo usando el programa informático GraphPad Prism.

Fosforilación de IGF-1R mediante ELISA basada en células

Líneas de células de fibroblastos de ratón que expresan de forma recombinante IGF-1R humano o IR-A humano se mantienen en DMEM suplementado con FCS inactivado por calor al 10%, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio al 0,075%, MEM NEAA y 0,3 µg/ml de puromicina a 37°C y 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada. Las células se separan con tripsina/EDTA, se resuspenden en medio de crecimiento y se diluyen hasta 100.000 células/mL. 100 µL (10.000 células) se siembran en pocillos de una placa estéril de 96 pocillos y se incuban durante una noche en una incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂. Después, las células son alimentadas con 100 µL/pocillo de medio de ensayo (DMEM suplementado con FCS inactivado por calor al 0,5%; piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio al 0,075% y MEM NEAA) y se incuban durante una noche como antes. A las células se añade una gama de concentraciones de anticuerpos de ensayo preparadas en medio de ensayo, todas las muestras se preparan por triplicado para determinar la desviación estándar para cada condición de ensayo. Un anticuerpo IGF-1R, αIR-3 (Calbiochem, Nº GR11L) también se somete a ensayo en estos experimentos. Luego se añade IGF-1 (20 ng/mL concentración final), IGF-2 (100 ng/mL concentración final), o suero humano (al 20% concentración final) y las placas se incuban durante 30 min en la incubadora humidificada. Las células se fijan reemplazando el medio de crecimiento por formaldehído al 4% en PBS durante 20 min a TA. Después de dos ciclos de lavado con 300 µL/pocillo de tampón de lavado (PBS con Triton X-100 al 0,1%) durante 5 min (con agitación) las células se enfrían rápidamente con 100 µL/pocillo de peróxido de hidrógeno al 1,2 % en peso en tampón de lavado durante 30 minutos a TA. Las células se lavan de nuevo con 300 µL/pocillo de tampón de lavado y se bloquean con 100 µL/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 5% en tampón de lavado) durante 60 min a TA con agitación. Se retira el tampón de bloqueo y se añaden 50 µL/pocillo de anticuerpo de receptor β de feto-IGF-1 primario (tyr1135/1136) / receptor de insulina β (tyr1150/1151) (Cell Signaling, Nº 3024) diluido en la relación 1:1000 en tampón de bloqueo. Las placas se incuban durante una noche a 4°C con agitación, después se lavan tres veces como antes y se añaden 50 µL/pocillo de inmunoglobulinas de cabra de IgG anti-conejo, conjugadas con peroxidasa de rábano picante (Dako, Nº P0448) diluida en la relación 1:500 en tampón de bloqueo. Después de 60 min de incubación a TA con agitación, los pocillos

se lavan dos veces con tampón de lavado como antes y una vez con 300 µL de PBS. A los pocillos se añaden 100 µL/pocillo de disolución de sustrato TMB (Bender MedSystems, Nº BMS406.1000) y se incuban durante 10 min con agitación, tras lo cual la reacción se detiene añadiendo 100 µL/pocillo de ácido fosfórico 1 M y se lee la absorbancia utilizando un fotómetro (DO 450 nm, DO 650 nm como referencia). Los valores CI_{50} de la inhibición de IGF-1R o de la fosforilación de IR-A se determinan mediante análisis gráfico.

Co-cristalización de Fab-IGF-1 y determinación de la estructura

Anticuerpos monoclonales se preparan en un tampón fosfato de Na 100 mM (pH 7,0) antes de la digestión con papaína. Papaína (Sigma Aldrich, P nº 3125) es activada en tampón de digestión (tampón fosfato que contiene hidrocloreuro de cisteína 10 mM, EDTA 4 mM, pH 7,0) siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo IgG se mezcla con la papaína activada (relación enzima:IgG = 1:100) y la reacción se incuba a 37°C en un sacudidor rotatorio durante una noche. La digestión se detiene añadiendo yodoacetamida hasta una concentración final de 30 mM. Con el fin de separar el fragmento Fab del fragmento Fc, los productos de escisión de Fc y el Mab intacto, la mezcla de digestión se carga en una columna con medio de proteína A MabSelect equilibrada con tampón fosfato. La columna se lava con 5 volúmenes de columna de PBS, y el fragmento Fab se recoge en las fracciones de flujo y de lavado. El fragmento Fc y el Mab intacto se eluyen de la columna con tampón citrato 100 mM (pH 3,0) y se efectúa una subsiguiente cromatografía de exclusión de tamaño del fragmento Fab utilizando una columna HiLoad Superdex 75. La columna se hace funcionar a razón de 0,5 mL por min con trietanolamina 20 mM, NaCl 130 mM, pH 8,0. La concentración en proteína de fragmentos Fab se determina midiendo la absorbancia a 280 nm. La calidad de los fragmentos Fab se analiza mediante transferencia Western y ELISA.

El complejo Fab-IGF-1 se genera añadiendo un exceso 2 veces molar del IGF-1 recombinante (Groppe; Calidad de Receptor) al Fab purificado que después se incuba durante una noche en un sacudidor con rotor a 4 °C. La concentración del complejo hasta (15 mg/mL) y la separación de IGF-1 no unido se efectúa utilizando un dispositivo Amicon-Ultra. La cristalización del complejo Fab:IGF-1 se lleva a cabo utilizando diversas técnicas tales como la gota colgante, la gota sentada y siembra. En una realización, el cristal se precipita poniendo en contacto la disolución con un depósito que reduce la solubilidad de las proteínas debido a la presencia de precipitantes, es decir, reactivos que inducen precipitación. El rastreo de diversas condiciones conduce a un sistema tampón adecuado manipulado mediante la adición de un precipitante y aditivos. La concentración de los precipitantes oscila preferiblemente entre 5-50 % p/v. El pH del tampón oscila preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6. La concentración de la proteína en la disolución es preferiblemente la de sobresaturación con el fin de permitir la precipitación. La temperatura durante la cristalización oscila preferiblemente entre 4 y 25°C.

La estructura tridimensional del complejo Fab:IGF-1, según se define por las coordenadas atómicas, se obtiene del modelo de difracción de rayos X del cristal y el mapa de la densidad de electrones derivado del mismo. La difracción de los cristales es mejor que una resolución de 2Å. Los cristales tienen preferiblemente el grupo espacial P3221 (número 154) y dimensiones de la celda unidad de aproximadamente = 70Å, b = 70Å, c = 195Å; y $\gamma = 120^\circ$. El método para determinar la estructura tridimensional es el reemplazo molecular, que implica el uso de la estructura de una molécula estrechamente relacionada o un complejo de receptor-ligando. La formación del modelo y el refinado se realizan en varias etapas iterativas hasta factores R (R y R_{free}) finales de 21 y 23%, respectivamente.

Determinación de parámetros farmacocinéticos en ratas

A ratas Wistar se les administran cinco administraciones por bolo intravenosas de 18, 52 y 248 mg/kg de anticuerpo cada 72 horas. A diversos instantes se toma una muestra de sangre y la concentración de anticuerpos humanos en el plasma se determina mediante ELISA sándwich. Esto permite calcular los parámetros farmacocinéticos medios del anticuerpo el primer día de dosificación, y la semivida se calcula después del último día de dosificación (con $t(n) = 1008$ horas).

Ejemplo 1

Selección de anticuerpos de alta afinidad, que se unen a IGF-1

Con el fin de identificar fragmentos Fab con una afinidad mejorada por IGF-1 humano, varios clones Fab 'parentales', que están identificados como que se unen a IGF-1 con una afinidad nanomolar baja, se someten a 'maduración de afinidad *in vitro*', en que las secuencias L-CDR3 y H-CDR2 de cada uno de los clones se diversifican por separado, sustituyendo la secuencia parental por una genoteca de nuevas secuencias de L-CDR3 y H-CDR2. Las 'genotecas de maduración' resultantes se someten a adsorciones en solución en IGF-1 humana y se seleccionan los clones con la mejor afinidad en cuanto a la conversión en anticuerpos IgG1 y se someten a ensayo adicionalmente. Los tres anticuerpos con las mejores afinidades por IGF-1 humano son 60814, 60819 y 60833, que tenían afinidades (K_D) de 180, 190 y 130 pM, respectivamente (mostradas en la Tabla 1) según se determinan por el método de titulación en equilibrio basado en electroquimioluminiscencia.

Tabla 1

Sumario de unión a IGF-1

Anticuerpo	Afinidad (pM)
60814	180
60819	190
60833	130

5 Los anticuerpos también se testan en cuanto a su unión a IGF-1 e IGF-2 humanas, murinas y de rata, e insulina humana, en ensayos de inmunosorbente. Esto demostró que 60814, 60819 y 60833 muestran una unión reactiva cruzada equiparable a IGF-1 de ratón y de rata, y con IGF-2 humano, murino y de rata, pero ninguna reactividad con la insulina humana (a la concentración más elevada testada, 50 ng/ml) (figuras 1A-1G).

10 Las constantes de afinidad para la unión de los anticuerpos a IGF-1 e IGF-2 humanos, de ratón y de rata vienen también determinadas por el análisis mediante resonancia de plasmón de superficie (Biacore). El método implica capturar los anticuerpos en el sensor y hacer fluir los antígenos de IGF por encima de los anticuerpos capturados, superando así cualquier efecto de avidéz que pudiera producirse si los antígenos de IGF se revisten sobre el sensor y los anticuerpos añadidos. Las constantes de afinidad utilizando este método para el anticuerpo 60833 se muestran en la Tabla 2, en donde puede verse que los valores K_D medidos para IGF-1 humano e IGF-2 humano son 0,07 nM y 0,9 nM, respectivamente.

15 Tabla 2.

Constantes de afinidad del anticuerpo 60833 para igf-1 e igf-2 humanos, de ratón y de rata determinadas mediante resonancia de plasmón de superficie (método de captura de anticuerpos)

Antígeno	$K_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$K_{off} [s^{-1}]$	$K_D [nM]$
IGF-1 humano	$4,74 \times 10^6$	$3,01 \times 10^{-4}$	0,07
IGF-1 de ratón	$1,00 \times 10^6$	$3,23 \times 10^{-4}$	0,33
IGF-1 de rata	$3,81 \times 10^6$	$2,53 \times 10^{-4}$	0,07
IGF-2 humano	$3,97 \times 10^6$	$3,53 \times 10^{-3}$	0,913
IGF-2 de ratón	$8,68 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-2}$	13,4
IGF-2 de rata	$2,56 \times 10^6$	$6,13 \times 10^{-3}$	2,41

Ejemplo 2

20 Inhibición de la señalización de IGF

El primer suceso de señalización que se produce después de la unión de IGFs al IGF-1R es la fosforilación del IGF-1R. Se utiliza un ensayo ELISA basado en células para medir la inhibición de la fosforilación de IGF-1R inducida por IGF por parte del anticuerpo 60833. Se determinan la potencia y eficacia (de hasta 15 $\mu\text{g/mL}$ (100 nM)) de 60833 en neutralizar la fosforilación de IGF-1R inducida por IGF-1 e IGF-2 recombinantes bioactivas. Tal como se muestra en la Tabla 3 y la Figura 2 del ejemplo 60833 inhibe de forma potente y efectiva la señalización inducida por IGF-1 (Figura 2A) e IGF-2 (Figura 2B). En el mismo ensayo, el mAb αIR3 dirigido a IGF-1R es mucho menos potente y efectivo con respecto a la señalización inducida por IGF-1, y exhibe un efecto muy débil sobre la señalización inducida sobre IGF-2.

30 Se utiliza un ELISA de fosforilación similar de IR-A basado en células para demostrar que 60833 también puede inhibir la señalización de IGF-2 a través de IR-A. Tal como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 3A de ejemplo, 60833 inhibe de forma potente y efectiva la fosforilación de IR-A inducida por IGF-2. En contraposición, αIR3 , que no puede unir IR-A, no muestra efecto inhibitor alguno.

El nivel de bioactividad de IGF en muestras de suero o plasma humano también se puede medir utilizando el ELISA basado en células de fosforilación de IGF-1R. Éste se utiliza para determinar la potencia y eficacia (hasta 15 $\mu\text{g/mL}$

(100 nM)) de 60833 en neutralizar la bioactividad de IGF en suero humano. Tal como se muestra en la Tabla 3 y la Figura 3B de ejemplo, 60833 inhibe de forma potente y efectiva la bioactividad de IGF en suero humano.

Tabla 3.

Efecto de 60833 sobre la fosforilación de IGF-1R

Estímulo de fosforilación de IGF-1R	Inhibidor	Cl ₅₀ (µg/mL)	% de fosforilación remanente a 15 µg/mL (100 nM) de inhibidor
IGF-1 (20 ng/mL)	60833	0,09	0
	αIR3	1,16	35
	IgG Control	>15	108
IGF-2 (100 ng/mL)	60833	1,12	7
	αIR3	>15	76
	IgG Control	>15	108
Suero humano agrupado de donantes sanos (20%)	60833	0,25	5
	αIR3	>15	120
	IgG Control	>15	110

5

Tabla 4.

Efecto de 60833 sobre la fosforilación de IR-A

Estímulo de fosforilación de IR-A	Inhibidor	Cl ₅₀ (µg/mL)	% de fosforilación remanente a 15 µg/mL (100 nM) de inhibidor
IGF-2 (100 ng/mL)	60833	0,82	6
	αIR3	>15	115
	IgG Control	>15	109

Ejemplo 3

10 Efectos sobre la proliferación celular inducida por IGF-1 e IGF-2

Se determinan los efectos de los anticuerpos 60814, 60819 y 60833 sobre la proliferación de la línea de células MCF-7 (derivada de cáncer de mama) y COLO 205 (derivada de cáncer de colon) inducida por IGF-1 e IGF-2. En las figuras 4A-D se muestran los efectos de los anticuerpos 60814 y 60819. Los tres anticuerpos muestran una inhibición, dependiente de la dosis, de la proliferación de células MCF-7 (Figs. 4A y 4B) y COLO 205 (Figs. 4C y 4D) inducida por IGF-1 (Figuras 4A y 4C) e IGF-2 (Figuras 4B y 4D). En la Tabla 5 se muestra la concentración de cada uno de los anticuerpos, requerida para inhibir el 50% de la proliferación de cada una de las líneas de células, inducida por IGF-1 o IGF-2.

15

Tabla 5.

Inhibición de la proliferación de las líneas de células cancerosas MCF-7 y COLO 205, inducida por IGF-1 E IGF-2

Línea de células	Estimulación	CI ₅₀ (ng/ml)		
		60814	60819	60833
MCF7	IGF-1	24,1	54,0	38,6
MCF7	IGF-2	78.,	40,8	81,2
COLO-205	IGF-1	135,0	216,9	165,1
COLO205	IGF-2	576,1	100,8	632,3

Ejemplo 4

5 Efectos sobre la proliferación de líneas de células derivadas de sarcoma de Ewing

El efecto de los anticuerpos 60819 y 60833 sobre la proliferación de la línea de células TC-71 derivada de sarcoma de Ewing hechos crecer en medio que contiene FCS al 10% se muestra en la Figura 5. Con relación a un anticuerpo control de isotipo IgG1 humanizado, que no se une a IGF-1 o IGF-2, tanto 60819 como 60833 muestran una inhibición de la proliferación de células TC-71 dependiente de la dosis.

10 Ejemplo 5

Efecto sobre los niveles totales de IGF-1 murina y de rata

Puede esperarse que la neutralización de IGF-1 activo con un anticuerpo diana de IGF dé lugar a una retroalimentación endocrina a través de la vía de GH, lo cual da lugar a elevados niveles totales de IGF-1 en suero. Los anticuerpos 60814, 60819 y 60833 tienen reactividad cruzada con IGF-1 de ratón y de rata, lo cual permite que se mida en estas especies cualquier efecto farmacodinámico sobre los niveles totales de IGF-1 en suero. Tal como se muestra en las Figuras 6 y 7, la administración de anticuerpo 60819 a ratones (Figura 6) y ratas (Figura 7) da como resultado un aumento, dependiente de la dosis, de niveles totales de IGF-1 murina y de rata, 24 horas post-administración. Esto representa un marcador farmacodinámico útil de la actividad de estos anticuerpos que puede ensayarse durante el desarrollo clínico en seres humanos.

20 Ejemplo 6

Efecto de la combinación de anticuerpos que tienen como diana el ligando de IGF y rapamicina sobre la proliferación de la línea de células derivada del sarcoma de Ewing y la señalización intracelular

En la Figura 8 se muestra el efecto de anticuerpos 60819 y el inhibidor mTOR rapamicina, solos o en combinación, sobre la proliferación de la línea de células SK-ES-1 derivada de sarcoma de Ewing. Existe una inhibición, dependiente de la dosis, tanto con los anticuerpos 60819 como con rapamicina sola, consiguiendo los dos agentes individuales una inhibición de la proliferación de alrededor del 60% a 100 nM. La combinación de dosis equivalentes tanto de los anticuerpos 60819 como de rapamicina demostró un efecto aditivo sobre la inhibición de la proliferación de células, con aproximadamente un 95% de inhibición cuando se combinan dosis de 100 nM.

La proliferación de células inducida por IGF es mediada a través de una cadena de sucesos de fosforilación de proteínas intracelulares. Una proteína, cuya fosforilación se incrementa por medio de la estimulación de IGF, es AKT. La Figura 9 demuestra el efecto del anticuerpo 60819 y rapamicina, solos o en combinación, sobre la fosforilación de AKT en células SK-ES-1 24 horas después del tratamiento, utilizando dosis de 100 nM. Comparado con células no tratadas proliferantes, que muestran una fosforilación de AKT, 100 nM de anticuerpo 60819 inhibían la fosforilación de AKT. A la inversa, el tratamiento con 100 nM de rapamicina dio como resultado niveles mayores de AKT fosforilado que el control, lo cual se piensa que es debido a un mecanismo de retroalimentación compensatorio, tras la inhibición de mTOR. Sin embargo, cuando se combinan 100 nM de rapamicina y 100 nM de anticuerpo 60819, se inhibe la fosforilación de AKT. Esto sugiere que la retroalimentación compensatoria que conduce a AKT fosforilado tras tratamiento con rapamicina es debida a la elevación de los ligandos de IGF y éstos son inhibidos por el anticuerpo 60819. La Figura 9 demuestra también que tanto el anticuerpo 60819 como rapamicina, solos o en combinación, no afectan a los niveles totales de PTEN.

Ejemplo 7

Efecto de la combinación de un anticuerpo que tiene como diana a un ligando de IGF y un inhibidor de EGFR sobre la proliferación de la línea de células derivada de NSCLC

- 5 En la Figura 10 se muestra el efecto de anticuerpos 60819 y al agente inhibidor de EGFR erlotinib/tarceva, solos o en combinación, sobre la proliferación de la línea de células A-549 derivada de NSCLC. En este modelo sólo existe un pequeño efecto de anticuerpo 60819 solo sobre la proliferación de células, mientras que tarceva muestra un efecto dependiente de la dosis con una inhibición de alrededor de 60% de la proliferación celular a la dosis más elevada sometida a ensayo (20 μ M). Sin embargo, cuando se combina el anticuerpo 60819 y tarceva, existe una inhibición más potente y eficaz de la proliferación celular, indicativa de un efecto sinérgico.

10 Ejemplo 8

Propiedades farmacocinéticas en ratas Wistar

En la Tabla 6 se muestran los parámetros farmacocinéticos medios del anticuerpo 60833 en ratas Wistar el primer día de dosificación con 18, 52 y 248 mg/kg. La semivida terminal se calculó después del último día de dosificación (con $t(n) = 1008$ horas), la semivida terminal media para los tres niveles de dosis es 221 h (9,2 días).

15 Tabla 6.

Parámetros farmacocinéticos medios de anticuerpo 60833 en ratas Wistar el primer día de dosificación

	Dosis de 60833 (mg/kg)		
	18	52	248
C(max) [mg/mL]	0,531	1,70	5,56
AUC(0-72h) [mg·h/mL]	15,5	40,2	120
CL [(mL/día)/kg]	22,9	28,7	37,3
V(ss) [mL/kg]	68,1	76,3	65,4
$t_{1/2\Phi}$ [h]	210	197	255

Φ = después del último día de dosificación con $t(n) = 1008$ h

Ejemplo 9

- 20 Co-cristalización de Fab-IGF-1 y determinación de la estructura para identificar los sitios de unión del anticuerpo en IGF-1

- 25 Para determinar definitivamente los residuos en IGF-1 humano que interactúa con los anticuerpos de IGF, el Fab e IGF-1 se co-cristalizaron y se determinó la estructura de la interacción con una resolución mejor que 2Å. En la Tabla 7 se muestran los residuos en IGF-1 que son contactados por el anticuerpo (Fab) 60833. En total, 19 residuos en IGF-1 hacen contacto con 15 residuos de CDR en 60833. De estos 19 residuos en IGF-1, 17 son idénticos en IGF-2 humano cuando se alinean las secuencias de aminoácidos de IGF-1 e IGF-2 humanos (listadas en la Tabla 7). La figura 11 muestra la estructura 3D de IGF-1 con los aminoácidos que están unidos por 60833 resaltados, también se muestra la secuencia lineal de aminoácidos de IGF-1 humano con los aminoácidos interactuantes subrayados.

Tabla 7

Residuos en IGF-1 humano que hacen contacto con residuos de FAB de 60833

Residuos de IGF-1 en contacto con 60833	Residuos de contacto en 60833 (CDR)	Residuo homólogo en IGF-2
Leu (L) 5	Tyr (Y) 54; (HCDR 2)	Leu (L) 8
Cys (C) 6	Ser (S) 56; (HCDR 2)	Cys (C) 9
Glu (E) 9	Thr (T) 52; (HCDR 2) Ser (S) 53; (HCDR 2)	Glu (E) 12

ES 2 561 045 T3

	Tyr (Y) 54; (HCDR 2) Gly (G) 55; (HCDR 2) Ser (S) 56; (HCDR 2)	
Leu (L) 10	Phe (F) 57; (HCDR 2)	Leu (L) 13
Asp (D) 12	Trp (W) 33; (HCDR 1)	Asp (D) 15
Ala (A) 13	Trp (W) 33; (HCDR 1)	-
Phe (F) 16	Trp (W) 33; (HCDR 1) Arg (R) 92; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3) Trp (W) 99; (LCDR 3) Tyr (Y) 101; (HCDR 3)	Phe (F) 19
Val (V) 17	Arg (R) 92; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	Val (V) 20
Arg (R) 21	Tyr (Y) 95; (LCDR 3)	Arg (R) 24
Cys (C) 47	Ser (S) 56; (HCDR 2) Phe (F) 57; (HCDR 2)	Cys (C) 46
Cys (C) 48	Ser (S) 56; (HCDR 2)	Cys (C) 47
Phe (F) 49	Tyr (Y) 54; (HCDR 2) Gly (G) 55; (HCDR 2) Ser (S) 56; (HCDR 2)	Phe (F) 48
Ser (S) 51	Gly (G) 55; (HCDR 2) Ser (S) 56; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2)	Ser (S) 50
Cys (C) 52	Ser (S) 56; (HCDR 2) Phe (F) 57; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2)	Cys (C) 51
Asp (D) 53	Phe (F) 57; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2)	Asp (D) 52
Leu (L) 54	Trp (W) 33; (HCDR 1) Phe (F) 57; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	Leu (L) 53
Arg (R) 55	Lys (K) 65; (HCDR 2) Gly (G) 96; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	-

Leu (L) 57	Phe (F) 57; (HCDR 2)	Leu (L) 56
Glu (E) 58	Tyr (Y) 95; (LCDR 3) Gly (G) 96; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	Glu (E) 57
19 residuos en IGF-1 implicados en el contacto con 60833	15 residuos en 60833 implicados en contactos con IGF-1: HCDR 1: 1 residuo HCDR 2: 8 residuos HCDR 3: 1 residuo LCDR 1: - LCDR 2: - LCDR 3: 5 residuos	

Referencias

- Barbas, et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813.
- Burtrum et al., Cancer Res. 63: 8912-21, 2003).
- 5 Chen et al., J. Clin. Endocrinol. 90: 366-371, 2005.
- Cui et al., Science 299: 1753-55, 2003.
- Cruz-Correa et al., Gastroenterology 126: 1190-3, 2004.
- Dufner y Thomas, Exp. Cell Res. 253: 100-109, 1999.
- Frasca et al., Mol. Cell. Biol. 19: 3278-88, 1999.
- 10 Freier et al., Gut, May; 44(5): 704-08, 1999;
- Fukuzawa et al., Int. J. Cancer 82: 490-497, 1999.
- Goetsch et al., Int. J. Cancer 113: 316-28, 2005.
- Goya et al., Cancer Res. 64: 6252-58, 2004.
- Haenel et al., Anal. Biochem. 339: 182-184, 2005.
- 15 Hassan et al., Cancer Res. 60: 1070-6, 2000
- Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226(3): 889 896.
- Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9.
- Jerome et al., End. Rel. Cancer 10: 561-578, 2003.
- 20 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5ª Ed.). Publicación NIH N° 91 3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).
- Kipriyanow y Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39-60, 2004.
- Knappik et al., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000.
- Kolb et al. Pediatr. Blood Cancer 50: 1190-1197, 2008.
- Krebs, B. et al., J. Immunol. Meth. 245: 67 84, 2001.

- Kulik et al., *Mol. Cell. Biol.* 17: 1595-606, 1997.
- LeRoith D, *Experimental Diab. Res.* 4: 205-212, 2003.
- Li et al., *Tumour Biol.* 25: 62-8, 2004.
- Lowman et al., *Biochemistry* 30(45): 10832-10837, 1991.
- 5 Lund et al., *Cancer Lett.* 206: 85-96, 2004.
- Manara et al., *Clin. Cancer Res.* 13: 1322-1330, 2007.
- Manes et al., *Endocrinology* 138: 905-915, 1997.
- Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783.
- Miyamoto et al., *Clin. Cancer Res.* 11: 3494-3502, 2005.
- 10 Moorhead et al., *Oncogene* 22: 853-7, 2003.
- Nagy et al., *Nature Med.* 8(8): 801-807, 2002.
- Ng et al., *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 152-7, 1998.
- Pandini et al., *J. Biol. Chem.* 277: 39684-95, 2002.
- Pollack et al., *Nature Rev. Can.* 4: 505-518, 2004.
- 15 Pollack et al., American Society for Clinical Oncology (ASCO), Annual Meeting 2007, abstract 3587.
- Quinn et al., *J. Biol. Chem.* 271: 11477-83, 1996.
- Rauchenberger, R. et al., *J. Biol. Chem.* 278: 38194-38205, 2003.
- Reinberg, U.S. News World Report, March 5, 2008.
- 20 Remington: "The Science and Practice of Pharmacy", 2005, 21^a edición, Hendrickson Randy, Editor; Advanced Concepts Institute, University of The Sciences in Philadelphia, 600 S. 43rd Street, Philadelphia, PA 19104, EE.UU.; 215-895-1184.
- Renehan et al., *Br. J. Cancer* 83: 1344-50, 2000a).
- Renehan et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 3402-8, 2000b).
- Revets et al., *Expert Opin Biol Ther.* 5(1):111-24, 2005.
- 25 Rubin et al., *Lab. Invest.* 73: 311-31, 1995.
- Russell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81: 2389-2392, 1984.
- Scotlandi et al., *Cancer Res.* 56: 4570-4574, 1996.
- Sell et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11217-21, 1993.
- Sell et al., *Mol. Cell. Biol.* 14: 3604-12, 1994.
- 30 Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155.
- Shukla et al., 2007, *J. Chromatography B*, 848(1): 28-39
- Srinivasan, M. and Roeske, RW., *Curr Protein Pept Sci.* 2005, Abr;6(2):185-96.
- Strumberg D., 2005, *Drugs Today (Barc).* 2005 Dic;41(12):773-84
- Takanami et al., *J. Surg. Oncol.* 61: 205-8, 1996.
- 35 Tsai et al., *Scand. J. Gastroenterol.* 40: 68-75, 2005.
- Wang et al., *World J. Gastroenterol.* 9: 267-70, 2003.
- Woodson et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 96: 407-10, 2004.

Yao et al., Clin. Cancer Res. 9: 2719-26, 2003a).

Yao et al., J. Clin. Invest. 111: 265-273, 2003b).

Yelton et al., 1995, Immunol. 155:1994-2004.

Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062, 1995.

5 Zhao et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14: 1819-22, 2005.

Documento WO 89/011297.

Documento WO 94/29348.

Documento WO 02/056910.

Documento WO 03/002609.

10 Documento WO 03/050531.

Documento WO 03/093317.

Documento WO 04/003019.

Documento WO 04/058821.

Documento WO 2005/018671.

15 Documento WO 2005/027970.

Documento WO 2005/028515.

Documento WO 2007/042309.

Documento WO 2007/070432.

Documento JP 2003-310275.

20 Documento US 4.342.566.

Documento US 3.773.919.

Documento US 6.696.245.

Documento US 6.991.790.

Documento US 7.060.268.

25

Listado de secuencias

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Anticuerpos Anti-IGF

<130> 12-0295

<160> 43

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Tyr Trp Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser

ES 2 561 045 T3

```

1          5          -          .          -

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe Asn Val
1          5          10

<210> 7
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(366)

<400> 7
cag gtg gaa ttg gtg gaa agc ggc ggc ggc ctg gtg caa ccg ggc ggc      48
Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

agc ctg cgt ctg agc tgc gcg gcc tcc gga ttt acc ttt tct aat tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20          25          30

tgg atg cat tgg gtg cgc caa gcc cct ggg aag ggt ctc gag tgg gtg      144
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

agc ggt atc tct ggt tgg tct agc tgg acc tat tat gcg gat agc gtg      192
Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

aaa ggc cgt ttt acc att tca cgt gat aat tcg aaa aac acc ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcg gaa gat acg gcc gtg tat tat tgc      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

gcg cgt ttt ggt att gat gct tat act aag gtt tat ttt gat tat tgg      336
Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
100          105          110

ggc caa ggc acc ctg gtg acg gtt agc tca      366
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

<210> 8
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

```

ES 2 561 045 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 9
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 9	
gat atc gaa ctg acc cag ccg cct tca gtg agc gtt gca cca ggt cag	48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
acc gcg cgt atc tcg tgt agc ggc gat aat att cct ctt aag tat gtt	96
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val	
20 25 30	
tct tgg tac cag cag aaa ccc ggg cag gcg cca gtt ctt gtg att cat	144
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His	
35 40 45	
gat gat aat aag cgt ccc tca ggc atc ccg gaa cgc ttt agc gga tcc	192
Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
aac agc ggc aac acc gcg acc ctg acc att agc ggc act cag gcg gaa	240
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu	
65 70 75 80	
gac gaa gcg gat tat tat tgc tct tct tgg gat act ctt gat att ttt	288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe	
85 90 95	
aat gtg ttt ggc ggc ggc acg aag tta acc gtc cta ggt	327
Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
100 105	

ES 2 561 045 T3

<210> 10
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val
 20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe
 85 90 95

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

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Asn Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 561 045 T3

Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe Val Val
1 5 10

<210> 17
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(366)

<400> 17
cag gtg gaa ttg gtg gaa agc ggc ggc ggc ctg gtg caa ccg ggc ggc 48
Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

agc ctg cgt ctg agc tgc gcg gcc tcc gga ttt acc ttt tct aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

tgg atg cat tgg gtg cgc caa gcc cct ggg aag ggt ctc gag tgg gtg 144
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

agc ggt atc tct ggt tgg tct agc tgg acc tat tat gcg gat agc gtg 192
Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aaa ggc cgt ttt acc att tca cgt gat aat tcg aaa aac acc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ES 2 561 045 T3

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcg gaa gat acg gcc gtg tat tat tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 95
85

gcg cgt ttt ggt att gat gct tat act aag gtt tat ttt gat tat tgg 336
Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp 110
100

ggc caa ggc acc ctg gtg acg gtt agc tca 366
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 120
115

<210> 18
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 19
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 19 48
gat atc gaa ctg acc cag ccg cct tca gtg agc gtt gca cca ggt cag
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

acc gcg cgt atc tcg tgt agc ggc gat aat att cct ctt aag tat gtt 96
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val
 20 25 30

tct tgg tac cag cag aaa ccc ggg cag gcg cca gtt ctt gtg att cat 144
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His
 35 40 45

gat gat aat aag cgt ccc tca ggc atc ccg gaa cgc ttt agc gga tcc 192
 Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

aac agc ggc aac acc gcg acc ctg acc att agc ggc act cag gcg gaa 240
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

gac gaa gcg gat tat tat tgc cag tct tat gat tat ttt cct aag ttt 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe
 85 90 95

gtt gtg ttt ggc ggc ggc acg aag tta acc gtc cta ggt 327
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 20
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val
 20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe
 85 90 95

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

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Ser
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Asn Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Ser Arg Asp Thr Tyr Gly Tyr Tyr Trp Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 561 045 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 27
 cag gtg gaa ttg gtg gaa agc ggc ggc ggc ctg gtg caa ccg ggc ggc 48
 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 agc ctg cgt ctg agc tgc gcg gcc tcc gga ttt acc ttt act tct tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 tgg atg tct tgg gtg cgc caa gcc cct ggg aag ggt ctc gag ctt gtg 144
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 agc tct atc act tct tat ggt agc ttt acc tat tat gcg gat agc gtg 192
 Ser Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aaa ggc cgt ttt acc att tca cgt gat aat tcg aaa aac acc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg cgt gcg gaa gat acg gcc gtg tat tat tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg cgt aat atg tat act cat ttt gat tct tgg ggc caa ggc acc ctg 336
 Ala Arg Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 gtg acg gtt agc tca 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 561 045 T3

Ala Arg Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)

<400> 29
gat atc gtg ctg acc cag ccg cct tca gtg agt ggc gca cca ggt cag 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
cgt gtg acc atc tcg tgt agc ggc agc agc agc aac att ggt tct aat 96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30
tct gtg tct tgg tac cag cag ttg ccc ggg acg gcg ccg aaa ctt ctg 144
Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
att tat gat aat tct aag cgt ccc tca ggc gtg ccg gat cgt ttt agc 192
Ile Tyr Asp Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
gga tcc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctt gcg att acg ggc ctg caa 240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
agc gaa gac gaa gcg gat tat tat tgc cag tct cgt gat act tat ggt 288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Thr Tyr Gly
85 90 95
tat tat tgg gtg ttt ggc ggc ggc acg aag tta acc gtc cta ggt 333
Tyr Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 30
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

ES 2 561 045 T3

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 31
<211> 993
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(993)

<400> 31	
gcc tcc acc aag ggt cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag	48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
1 5 10 15	
agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac	96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20 25 30	
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc	144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35 40 45	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc	192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50 55 60	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc	240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
65 70 75 80	
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
85 90 95	
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc	336
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
100 105 110	
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca	384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
115 120 125	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
130 135 140	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145 150 155 160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528

ES 2 561 045 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg 576
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac 624
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg 672
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag 720
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat 768
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac 816
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc 864
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac 912
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 960
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 993
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 32
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

ES 2 561 045 T3

65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val ₈₅ Asn His Lys Pro Ser ₉₀ Asn Thr Lys Val ₉₅ Asp ₉₅ Lys			
Lys Val Glu Pro ₁₀₀ Lys Ser Cys Asp ₁₀₅ Lys Thr His Thr Cys ₁₁₀ Pro ₁₁₀ Pro Cys			
Pro Ala Pro ₁₁₅ Glu Leu Leu Gly ₁₂₀ Pro Ser Val Phe ₁₂₅ Leu ₁₂₅ Phe Pro Pro			
Lys Pro ₁₃₀ Lys Asp Thr Leu Met ₁₃₅ Ile Ser Arg Thr ₁₄₀ Pro ₁₄₀ Glu Val Thr Cys			
Val ₁₄₅ Val Val Asp Val ₁₅₀ Ser His Glu Asp Pro ₁₅₅ Glu ₁₅₅ Val Lys Phe Asn Trp ₁₆₀			
Tyr Val Asp Gly ₁₆₅ Val ₁₆₅ Glu Val His Asn ₁₇₀ Ala ₁₇₀ Lys Thr Lys Pro Arg ₁₇₅ Glu ₁₇₅			
Glu Gln Tyr Asn ₁₈₀ Ser Thr Tyr Arg ₁₈₅ Val ₁₈₅ Val Ser Val Leu ₁₉₀ Thr ₁₉₀ Val Leu			
His Gln Asp ₁₉₅ Trp Leu Asn Gly ₂₀₀ Lys ₂₀₀ Glu Tyr Lys Cys ₂₀₅ Lys ₂₀₅ Val Ser Asn			
Lys Ala ₂₁₀ Leu Pro Ala Pro ₂₁₅ Ile ₂₁₅ Glu Lys Thr Ile ₂₂₀ Ser ₂₂₀ Lys Ala Lys Gly			
Gln ₂₂₅ Pro Arg Glu Pro ₂₃₀ Gln Val Tyr Thr Leu ₂₃₅ Pro ₂₃₅ Pro Ser Arg Asp ₂₄₀ Glu ₂₄₀			
Leu Thr Lys Asn ₂₄₅ Gln ₂₄₅ Val Ser Leu Thr ₂₅₀ Cys ₂₅₀ Leu Val Lys Gly ₂₅₅ Phe ₂₅₅ Tyr			
Pro Ser Asp ₂₆₀ Ile ₂₆₀ Ala Val Glu Trp ₂₆₅ Glu ₂₆₅ Ser Asn Gly Gln ₂₇₀ Pro ₂₇₀ Glu Asn			
Asn Tyr Lys ₂₇₅ Thr Thr Pro Pro ₂₈₀ Val ₂₈₀ Leu Asp Ser Asp ₂₈₅ Gly ₂₈₅ Ser Phe Phe			
Leu Tyr ₂₉₀ Ser Lys Leu Thr ₂₉₅ Val ₂₉₅ Asp Lys Ser Arg Trp ₃₀₀ Gln Gln Gly Asn			
Val ₃₀₅ Phe Ser Cys Ser ₃₁₀ Val ₃₁₀ Met His Glu Ala ₃₁₅ Leu ₃₁₅ His Asn His Tyr ₃₂₀ Thr ₃₂₀			
Gln Lys Ser Leu ₃₂₅ Ser ₃₂₅ Leu Ser Pro Gly ₃₃₀ Lys ₃₃₀			

<210> 33

<211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(318)

<400> 33
 cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag 48
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc 96
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gga gat agc agc ccc gtc 144
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag 192
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc 240
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80
 cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 288
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag 318
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 34
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 35
<211> 452
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

ES 2 561 045 T3

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

ES 2 561 045 T3

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His
 35 40 45
 Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe
 85 90 95
 Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210
 <210> 37
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

ES 2 561 045 T3

20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

ES 2 561 045 T3

290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 38
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His
 35 40 45
 Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

ES 2 561 045 T3

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 39
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ser Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

ES 2 561 045 T3

Ala Arg Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

ES 2 561 045 T3

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 40
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp
 1 5 10 15

Arg

<210> 42
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met
 1 5 10

<210> 43
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

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

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
 20 25 30

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

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
 50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
 65 70

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo de ser humano aislada, la cual
 - a) se une a IGF-1 e IGF-2 de ser humano, tal que
 - i) se impide la unión de IGF-1 e IGF-2 al receptor de IGF-1 y
 - ii) se inhibe la transmisión de señales mediada por el receptor de IGF-1,
 - b) se une a IGF-1 e IGF-2 de ratón y de rata,
 - c) no se enlaza a insulina humana;

en donde dicha molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo que tiene CDRs de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) y SEQ ID NO:23 (CDR3) y que tiene CDRs de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) y SEQ ID NO:26 (CDR3).
2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28.
3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30.
4. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE.
5. La molécula de anticuerpo según la reivindicación 4, en donde la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es IgG1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32.
6. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región constante de cadena ligera es Igλ.
7. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 6, en donde la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.
8. La molécula de anticuerpo de las reivindicaciones 2 ó 3, que tiene
 - a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, y
 - b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40.
9. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la cual es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv de una única cadena.
10. Una molécula de ADN, que codifica la cadena variable pesada o la cadena variable ligera de una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. La molécula de ADN de la reivindicación 10, la cual tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27, que codifica la cadena pesada variable del anticuerpo definido en la reivindicación 2, y la cual tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 29, que codifica la cadena ligera variable del anticuerpo definido en la reivindicación 3.
12. Un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
13. El vector de expresión de la reivindicación 12, que contiene una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:27 y/o SEQ ID NO: 29.
14. El vector de expresión de la reivindicación 12 ó 13, que comprende, además, una molécula de ADN que codifica la cadena pesada constante y/o la cadena ligera constante, respectivamente, enlazada a la molécula de ADN que codifica la cadena pesada variable o la cadena ligera variable, respectivamente.
15. Una célula hospedante que porta uno o más vectores de expresión de la reivindicación 12, 13 ó 14.
16. La célula hospedante de la reivindicación 15, la cual es una célula de mamífero.
17. Un método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende

transfectar una célula hospedante de mamífero con uno o más vectores de las reivindicaciones 12 a 14, cultivar la célula hospedante y recuperar y purificar el anticuerpo.

18. Un método para producir un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende obtener una célula hospedante de mamífero que comprende uno o más vectores de las reivindicaciones 12 a 14, y cultivar la célula hospedante.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende, además, recuperar y purificar el anticuerpo.

20. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en medicina.

21. Molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de una enfermedad cancerosa seleccionada de cánceres del sistema hematopoyético que incluyen leucemias, linfomas y mielomas, cánceres del tracto gastrointestinal que incluyen cáncer de esófago, gástrico, colorrectal, pancreático, de hígado y de la vesícula biliar y cáncer del conducto biliar, en particular carcinoma hepatocelular, cáncer de riñón, próstata y vejiga; cánceres ginecológicos que incluyen cáncer de mama, de ovarios y de endometrio; cánceres de piel y de cabeza y cuello que incluyen melanomas malignos; cánceres pediátricos tales como el tumor de Wilms, neuroblastoma y sarcoma de Ewing; cánceres de cerebro tales como glioblastoma; sarcomas tales como osteosarcoma, sarcoma de tejido blando, rhabdomyosarcoma, hemangiosarcoma; cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas; mesotelioma y cáncer de tiroides.

22. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 21, en donde el medicamento se ha de utilizar en combinación con quimioterapia basada en platino, en particular terapia doble con platino paclitaxel/carboplatino o gemcitabina/cisplatino, sorafenib, o un compuesto seleccionado del grupo de inhibidores de EGFR, VEGF, HER2-neu, AuroraB, Plk1, PI3 quinasa, o mTor.

23. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 22, en donde el inhibidor de mTor es rapamicina, temsirolimus, deforolimus o everolimus.

24. Una composición farmacéutica, que comprende una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, que comprende, además, uno o más agentes terapéuticos adicionales, seleccionados de

a) agentes de deterioro del ADN,

b) compuestos terapéuticamente activos que inhiben vías de transducción de señales o puntos de chequeo mitóticos en células cancerosas,

c) antidiabéticos.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25, en donde dicho uno o más compuestos b) se seleccionan del grupo de agentes inhibidores de EGFR, VEGF, HER2-neu, AuroraB, Plk1, PI3 quinasa o mTor.

27. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, para uso en el tratamiento de una enfermedad cancerosa seleccionada de cánceres del sistema hematopoyético que incluye leucemias, linfomas y mielomas, cánceres del tracto gastrointestinal que incluyen cáncer esofágico, gástrico, colorrectal, pancreático, de hígado y de la vesícula biliar y cáncer del conducto biliar; cáncer de riñón, de próstata y de vejiga; cánceres ginecológicos que incluyen el cáncer de mama, de ovarios, cervical y de endometrio; cánceres de piel y cabeza y cuello que incluyen los melanomas malignos; cánceres pediátricos tal como el tumor de Wilms, el neuroblastoma y el sarcoma de Ewing; cánceres de cerebro tal como el glioblastoma; sarcomas tales como el osteosarcoma, el sarcoma de tejido blando, el rhabdomyosarcoma, el hemangiosarcoma; el cáncer de pulmón, el mesotelioma y el cáncer de tiroides.

28. La composición farmacéutica de la reivindicación 27, para ser utilizada adicionalmente en combinación con quimioterapia basada en platino, en particular terapia doble con platino paclitaxel/carboplatino o gemcitabina/cisplatino, sorafenib, o un compuesto seleccionado del grupo de inhibidores de EGFR, VEGF, HER2-neu, AuroraB, Plk1, PI3 quinasa, o mTor.

29. Un método *in vitro* para inhibir la unión de IGF-1 e IGF-2 al receptor de IGF-1 en una célula de mamífero, que comprende administrar a dicha célula una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se inhibe la señalización mediada por el receptor de IGF-1 y la proliferación y la anti-apoptosis mediada por IGF-1 e IGF-2.

30. Un método *in vitro* para inhibir la unión de IGF-2 al receptor de insulina IR-A en una célula de mamífero, que comprende administrar a dicha célula una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se inhibe la señalización mediada por el receptor de insulina IR-A y en el que se inhibe la proliferación y la anti-apoptosis mediada por IGF-2.

31. Un método in vitro para vigilar la eficacia del tratamiento de un paciente de cáncer con una molécula de anticuerpo que se une a IGF-1 e IGF-2, en donde dicha molécula es una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho método comprende

- (a) medir, en una muestra biológica de dicho paciente, el nivel de IGF-1 total,
- 5 (b) medir, en una muestra biológica de dicho paciente, el nivel de IGF-1 total después de administrar a dicho paciente dicha molécula de anticuerpo anti-IGF, en donde la magnitud de aumento en el nivel de IGF-1 total, comparada con el nivel de IGF-1 total medido en la etapa (a), indica en qué medida responde el paciente al tratamiento con dicha molécula de anticuerpo anti-IGF.

Fig. 1A

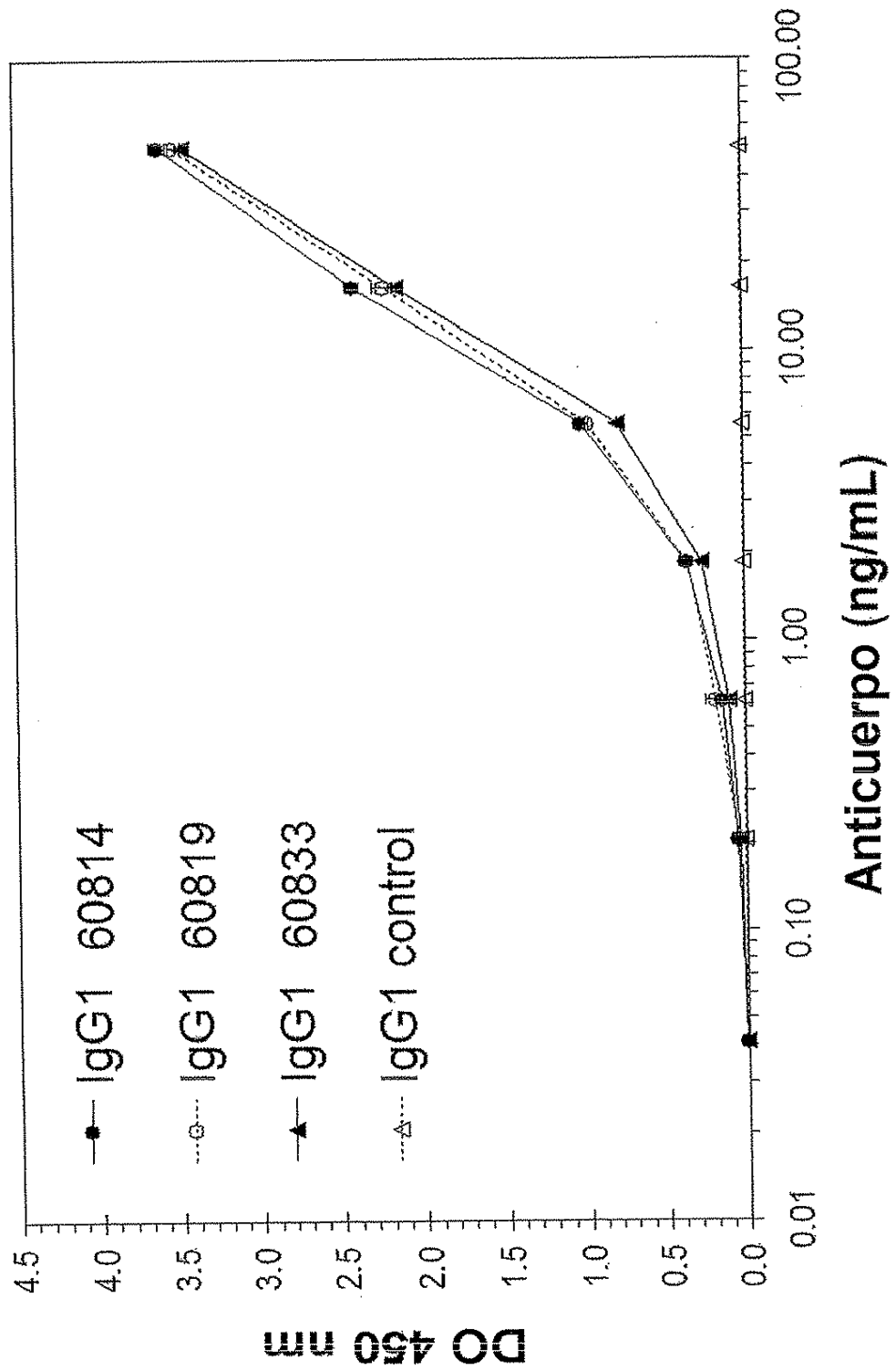


Fig. 1B

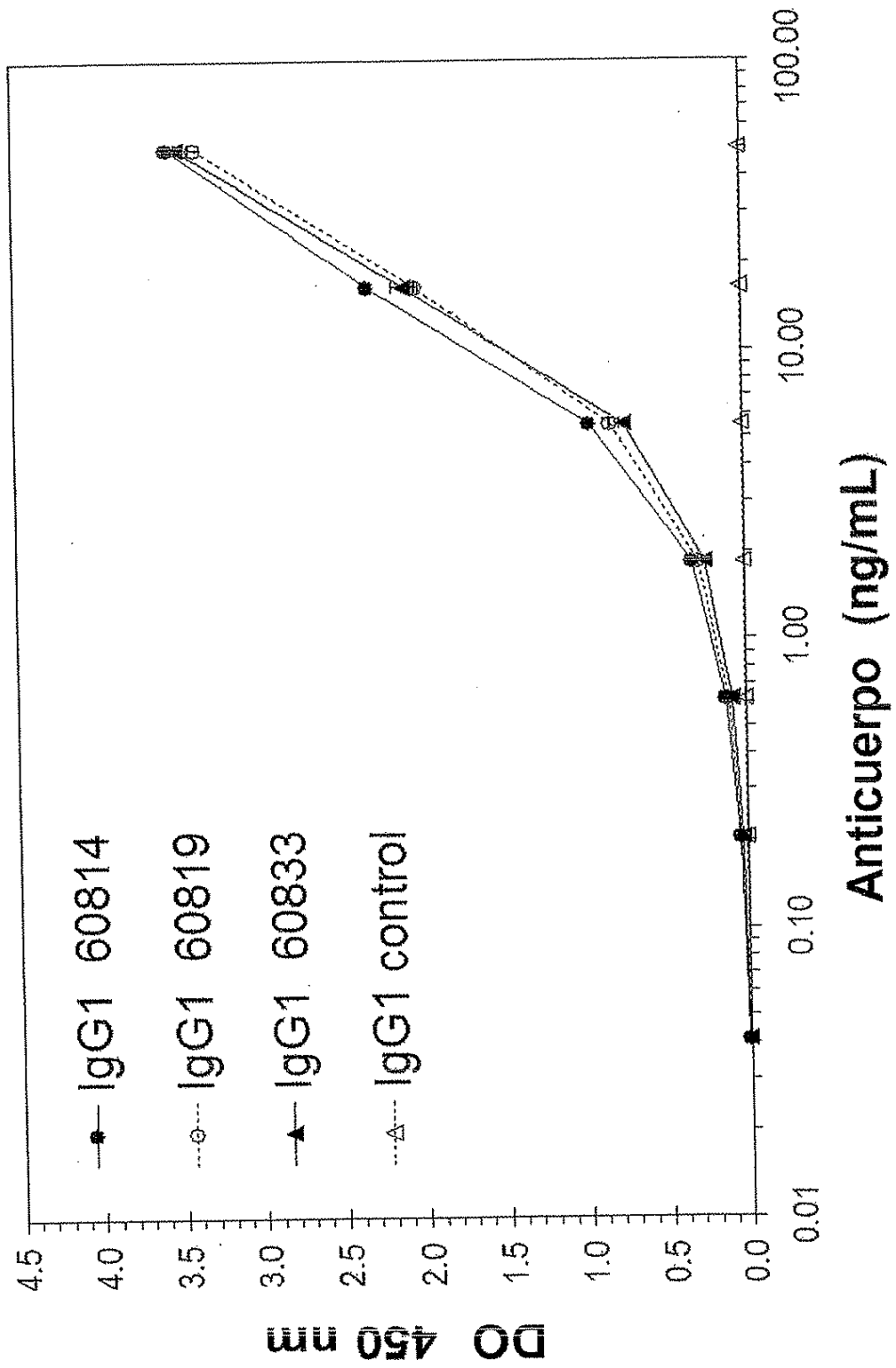


Fig. 1C

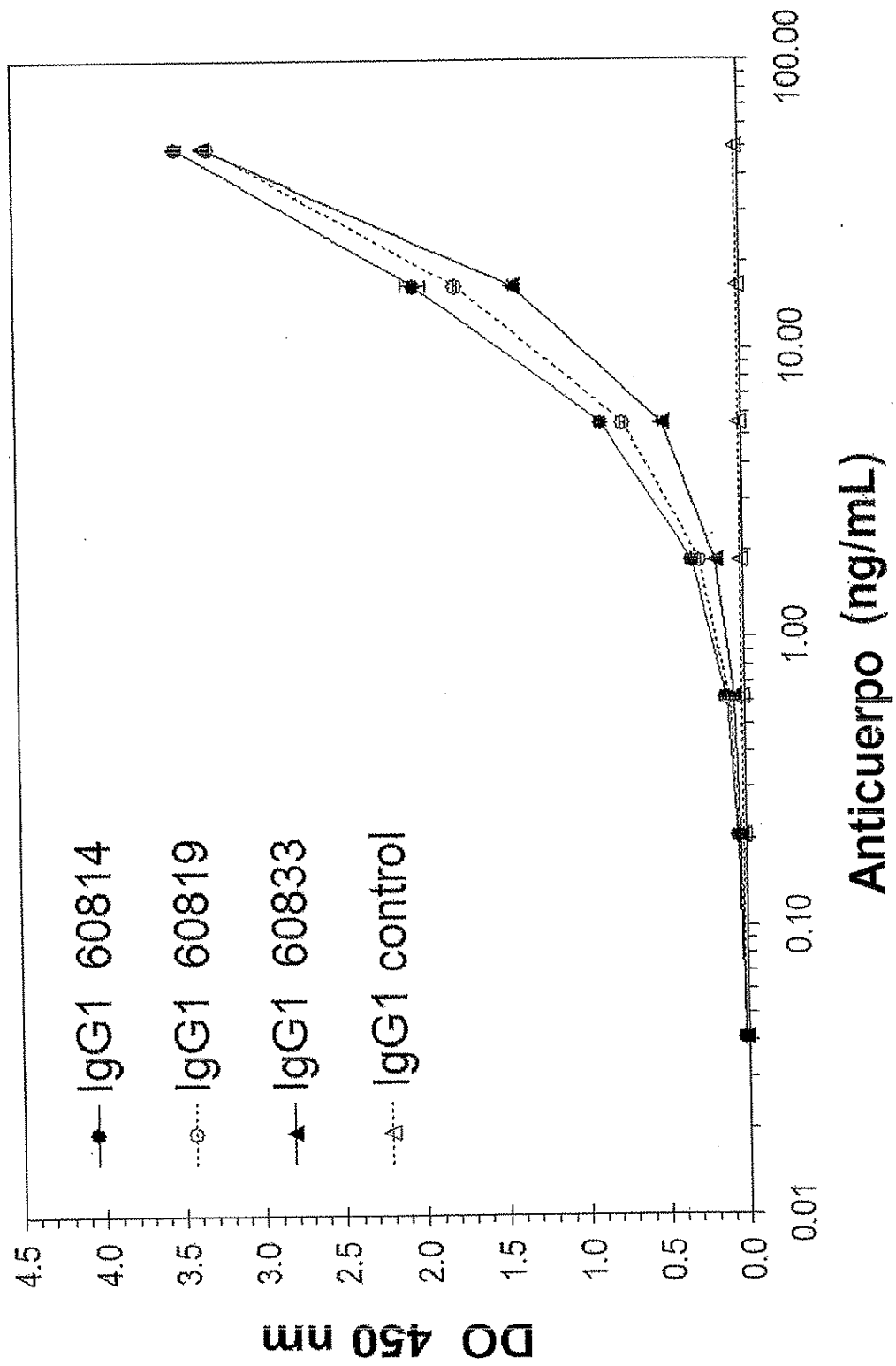


Fig. 1D

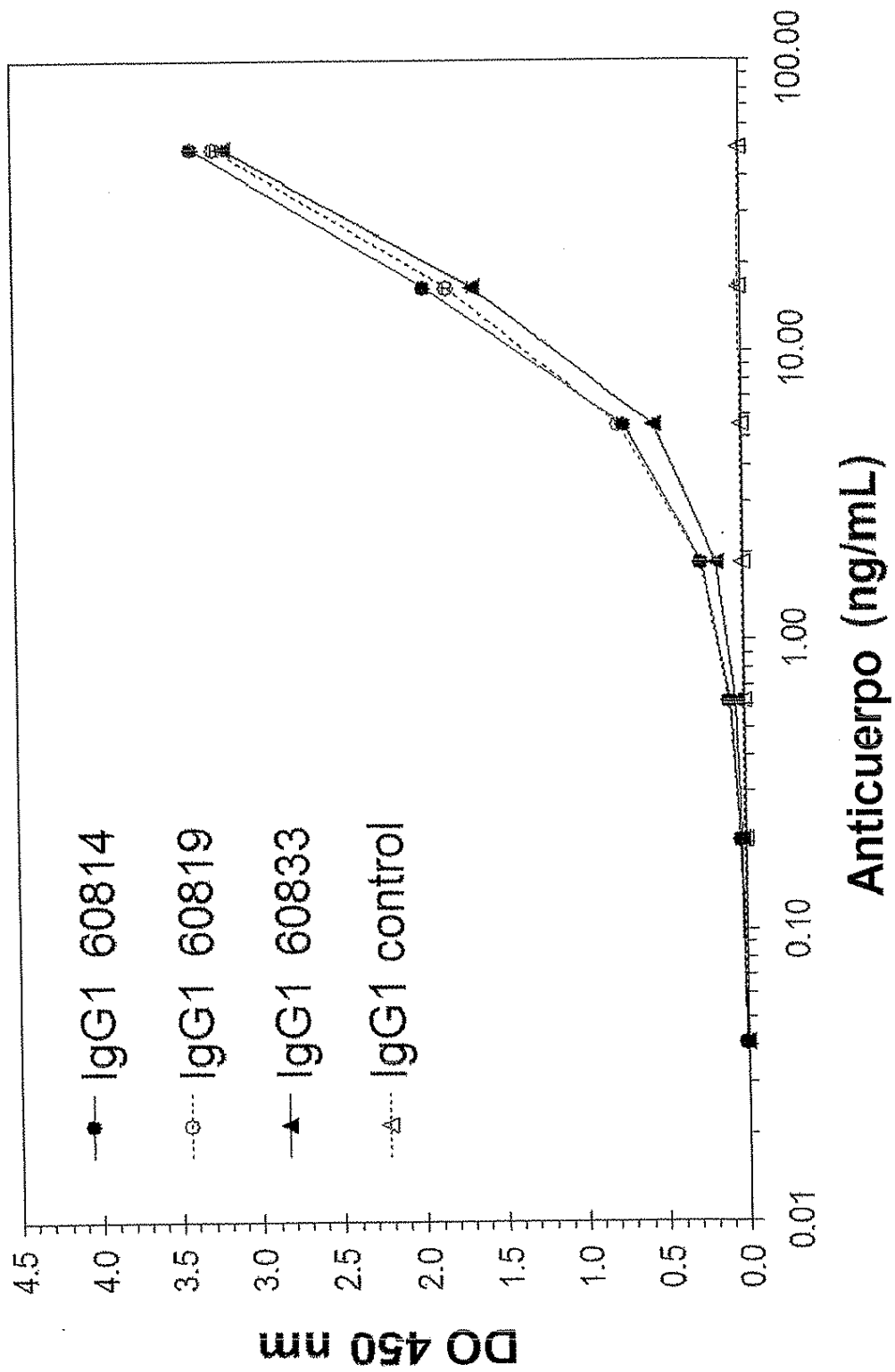


Fig. 1E

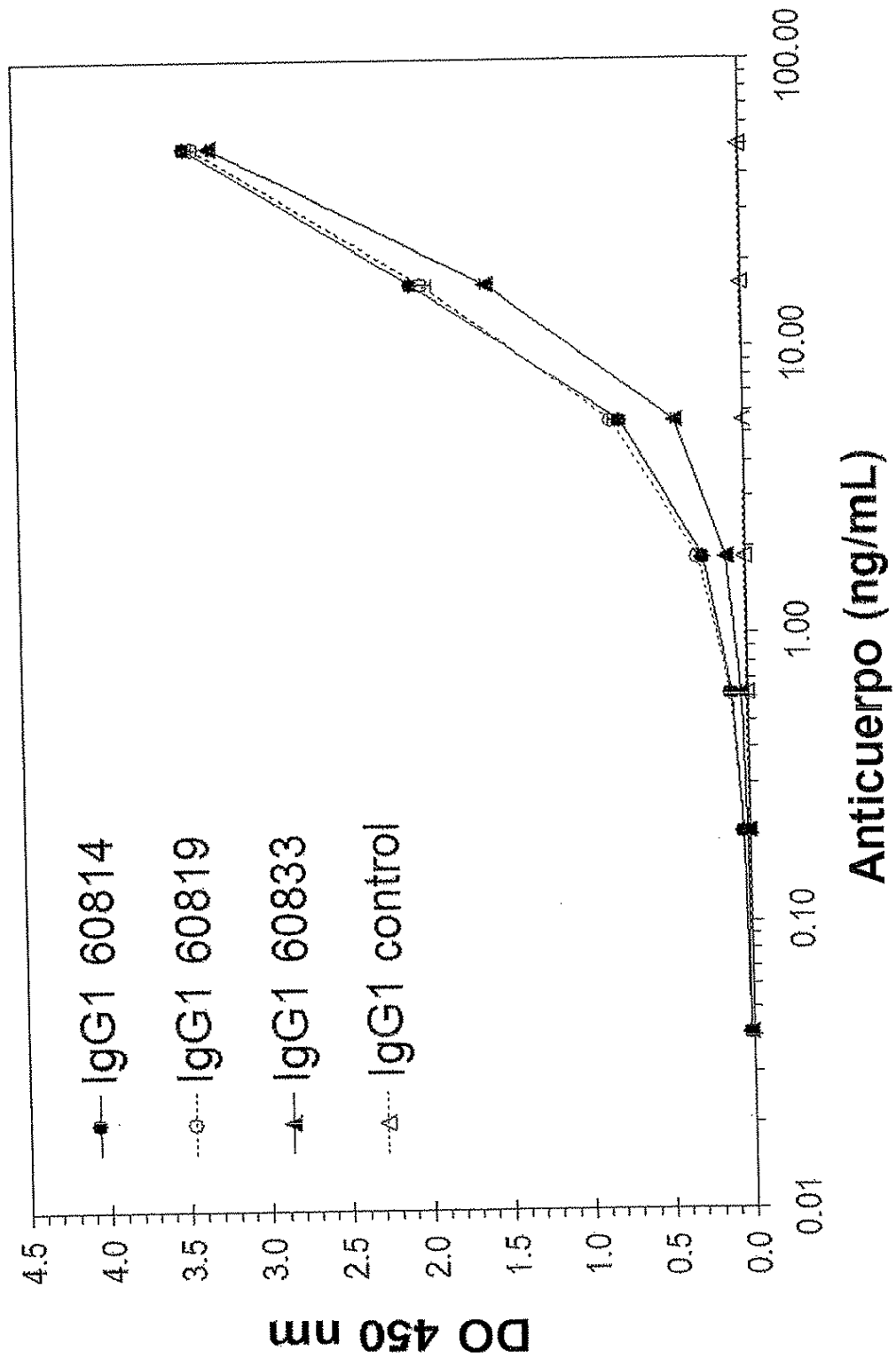


Fig. 1F

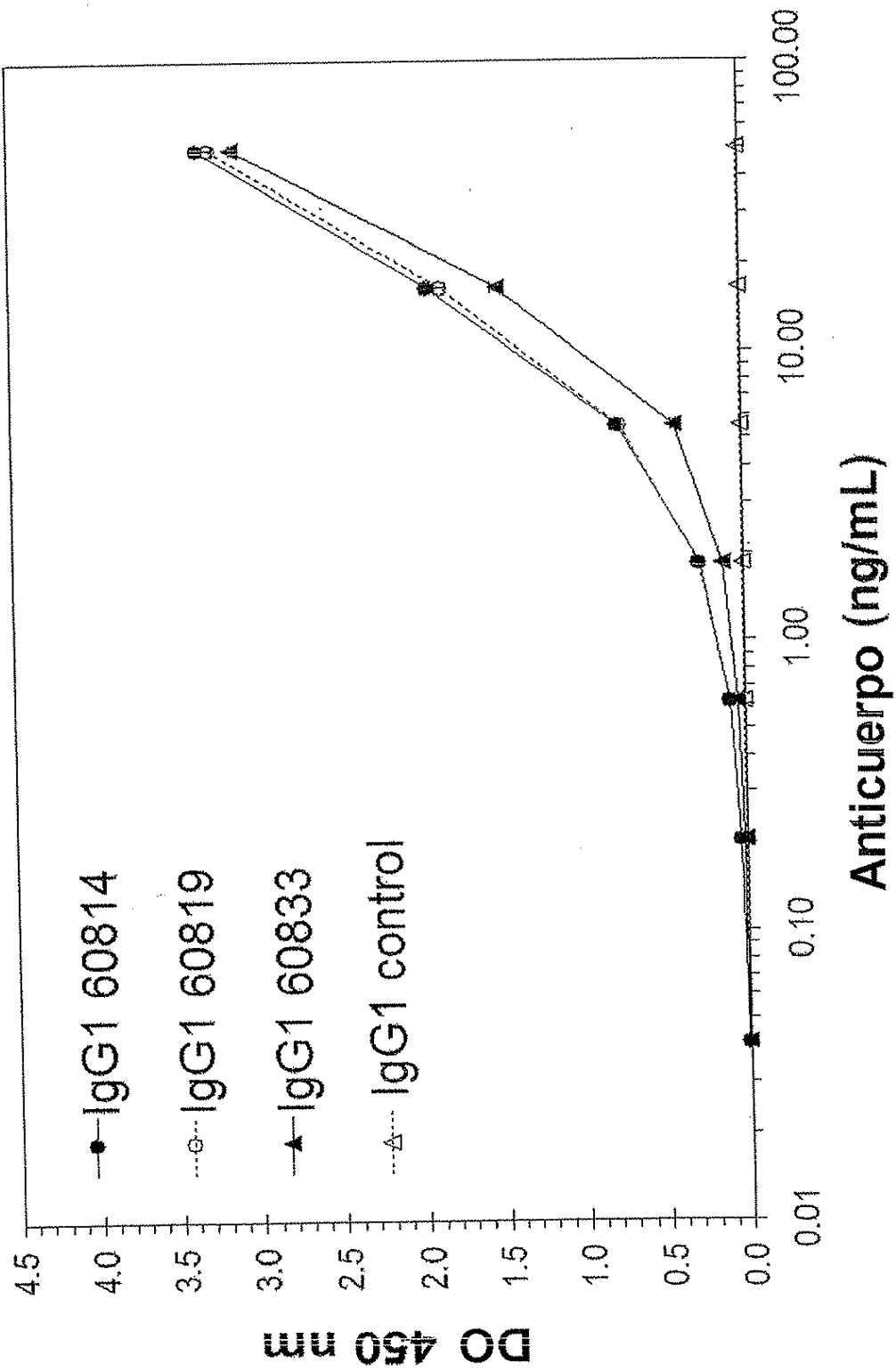


Fig. 1G

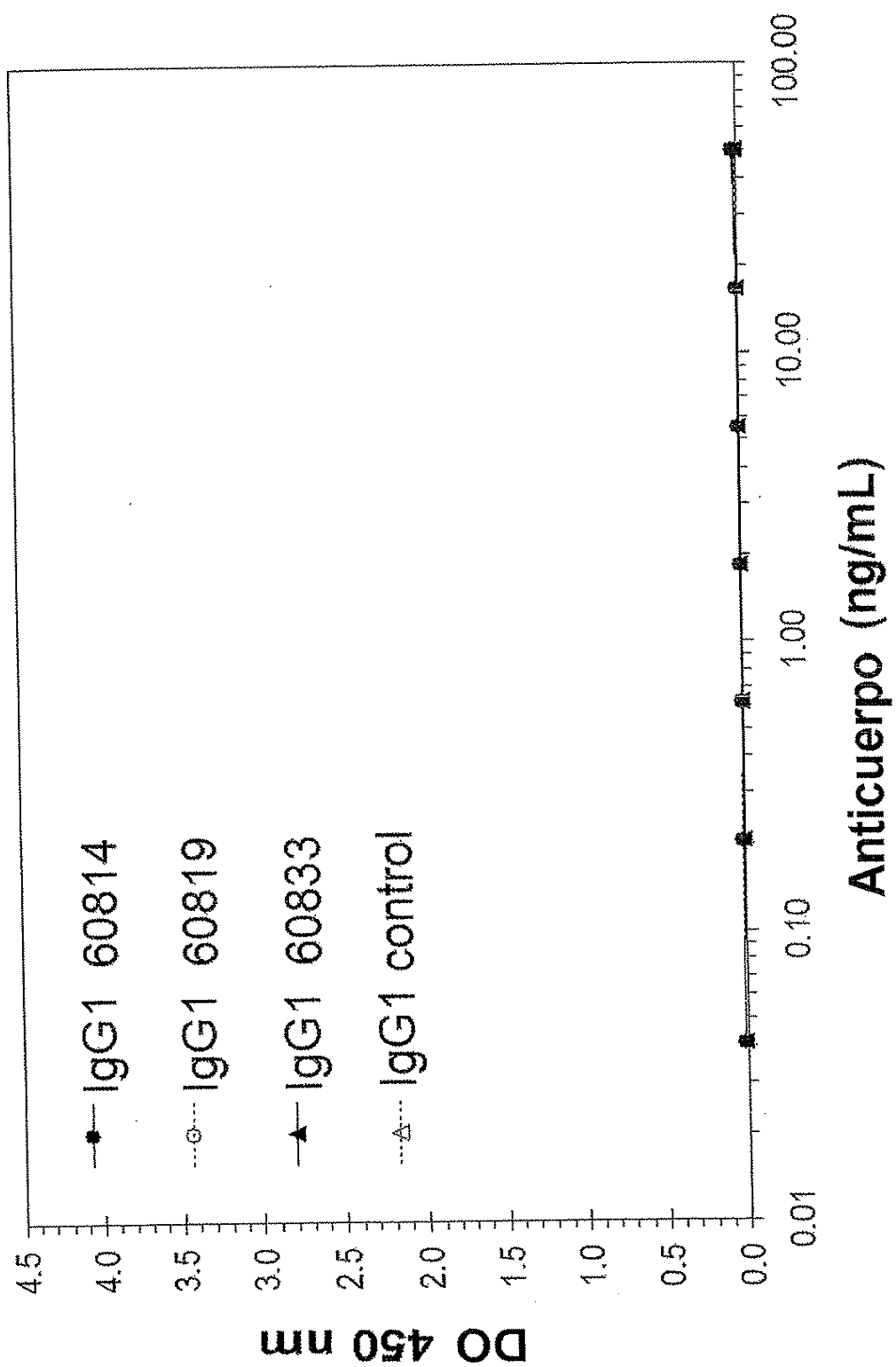


Fig. 2A

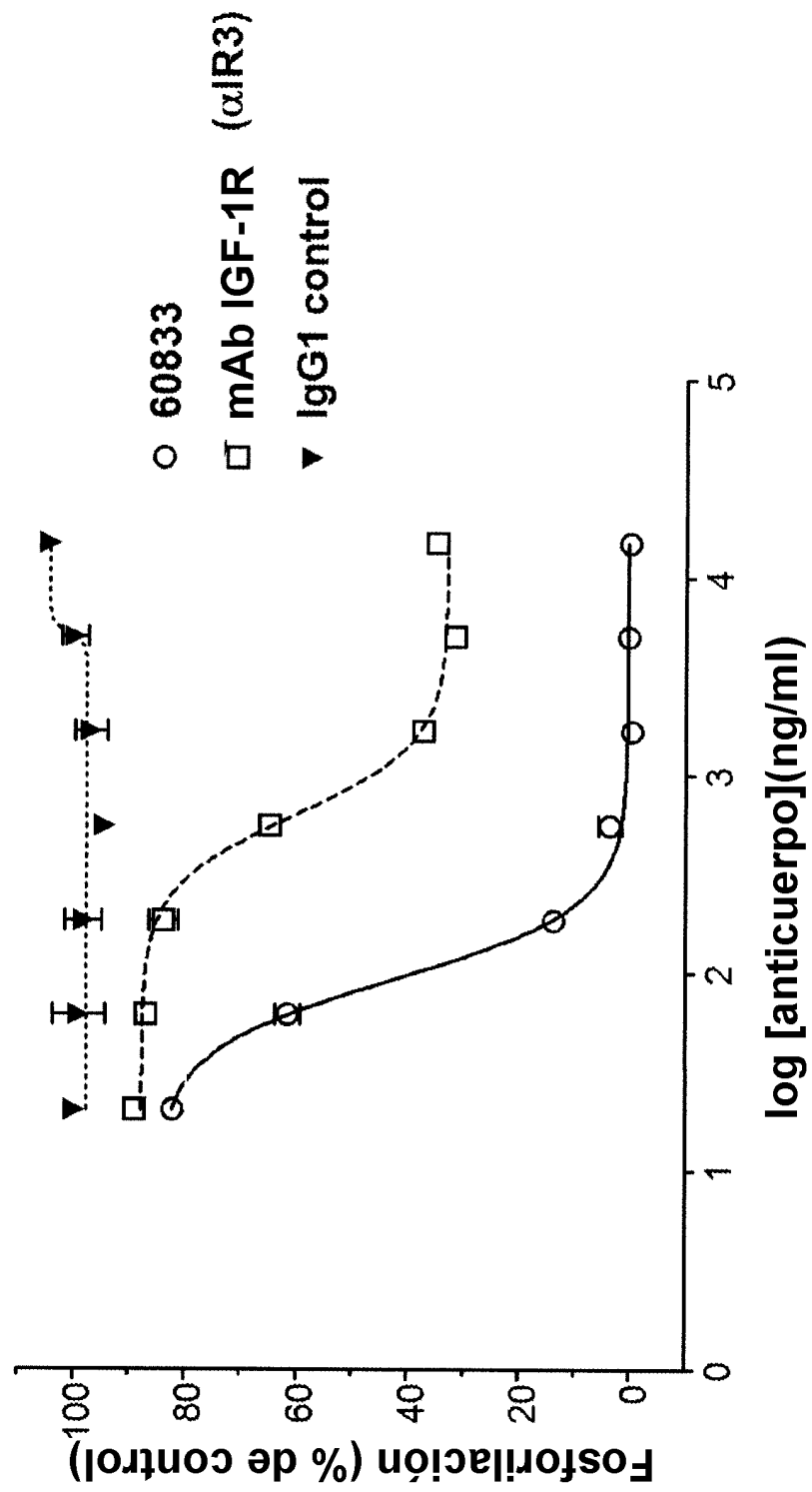


Fig. 2B

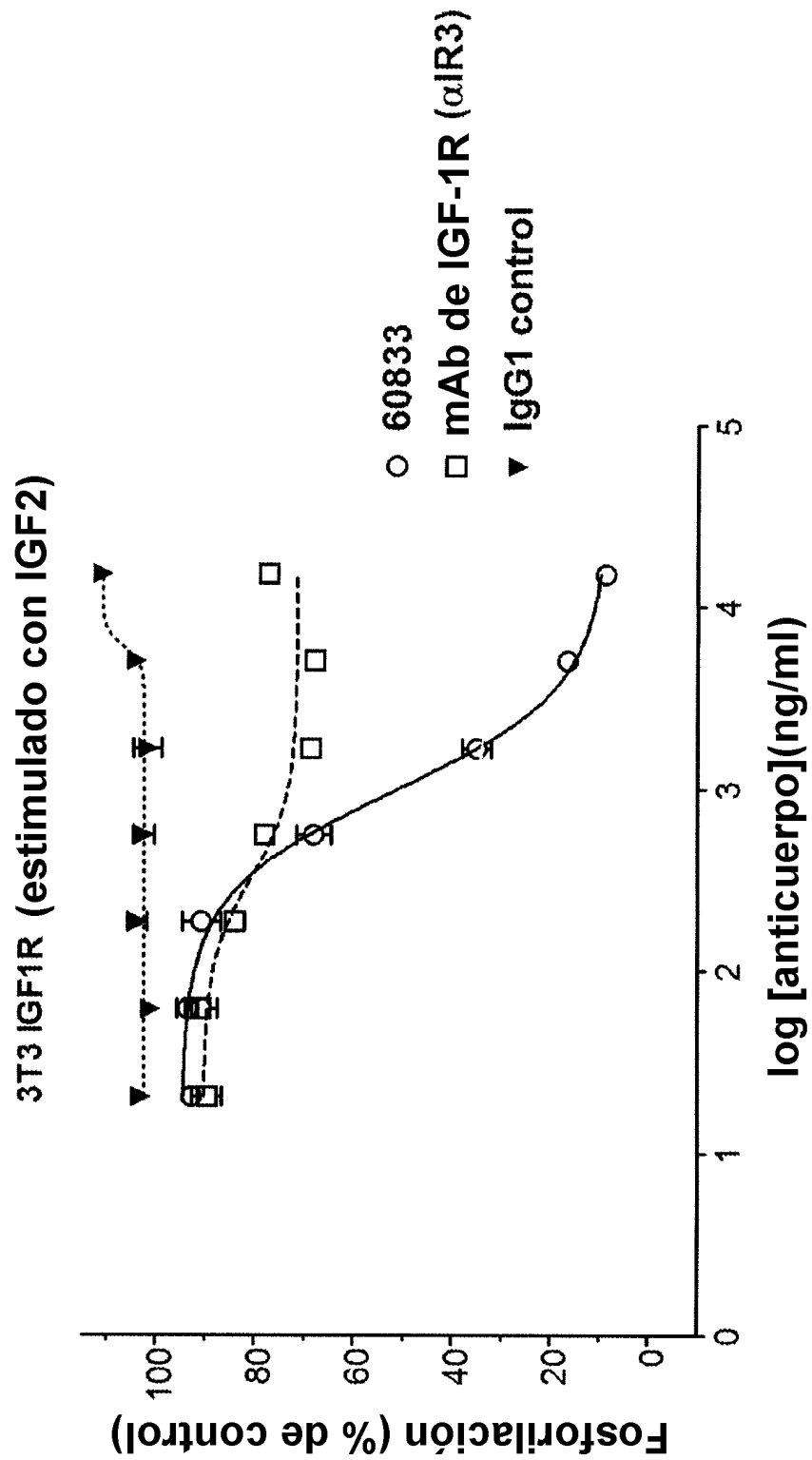
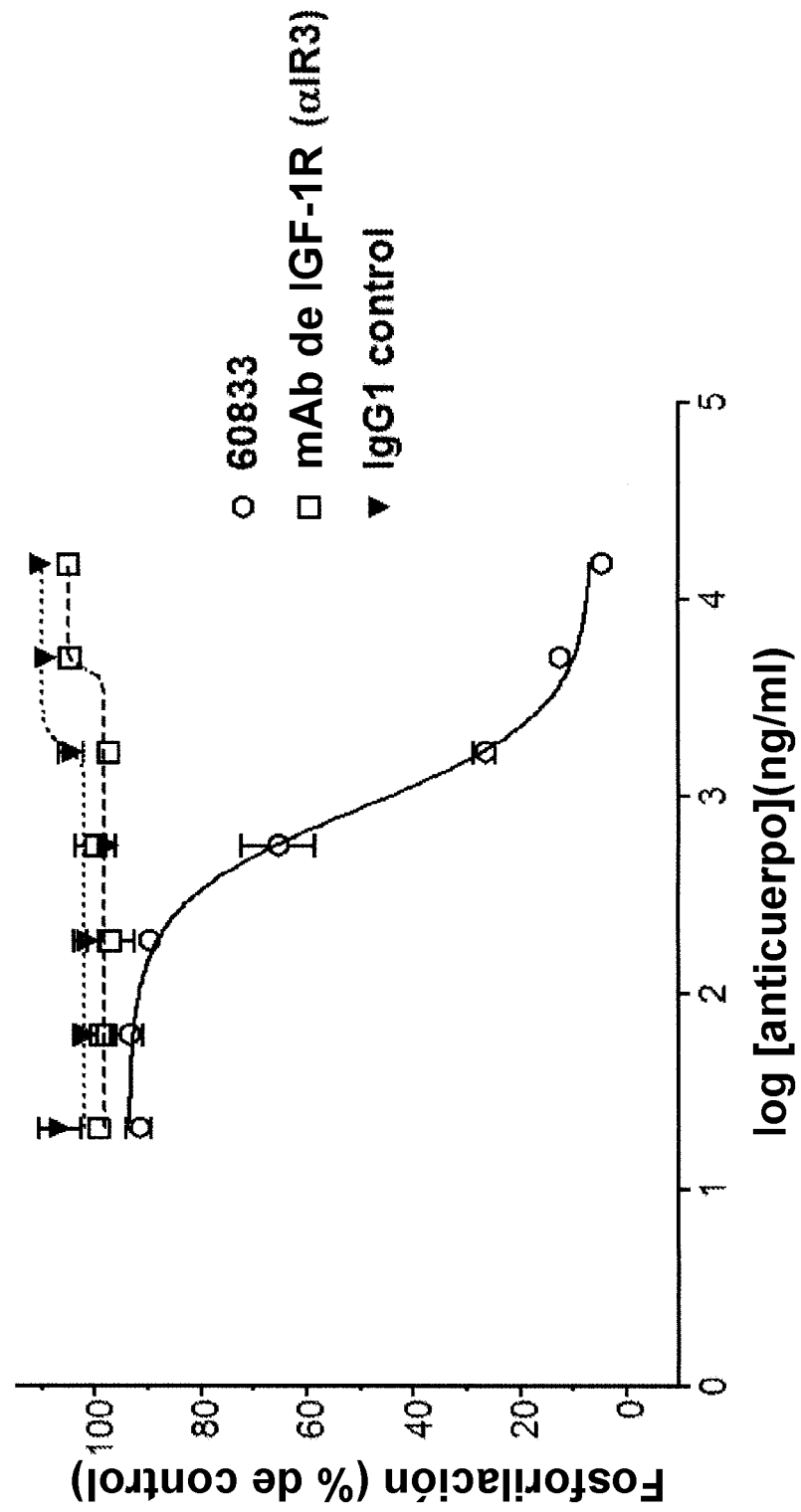


Fig. 3A



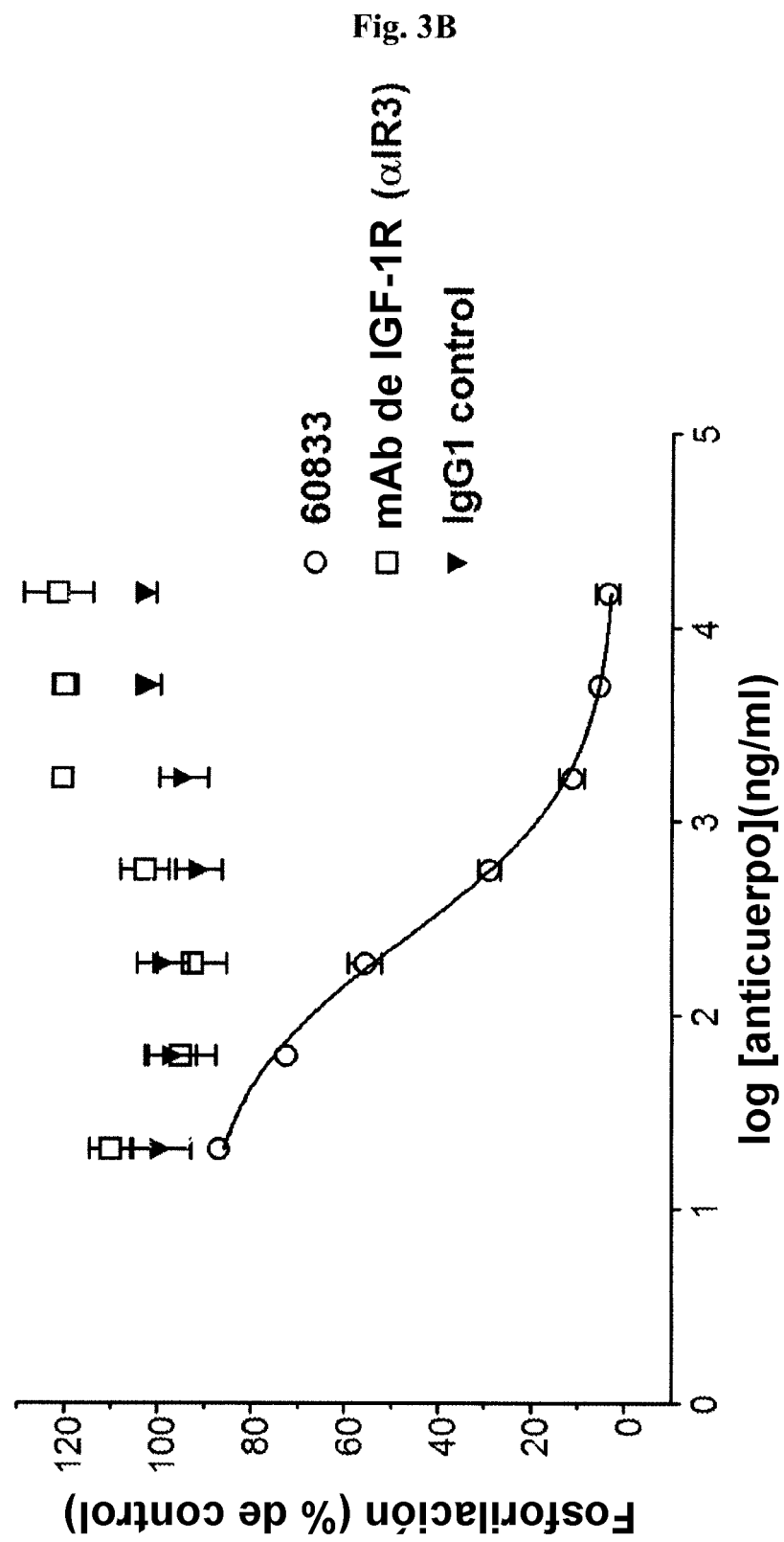


Fig. 4A

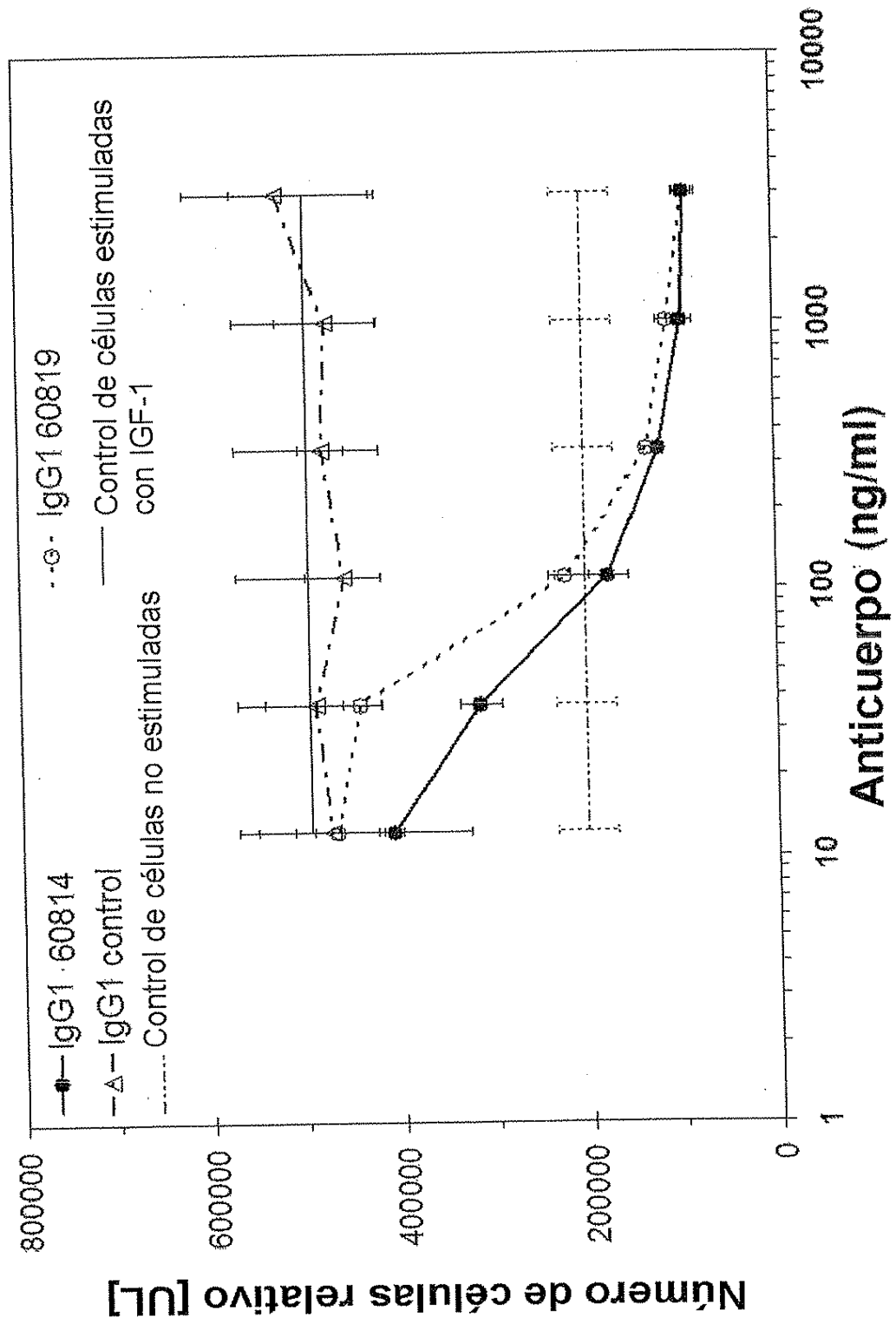


Fig. 4B

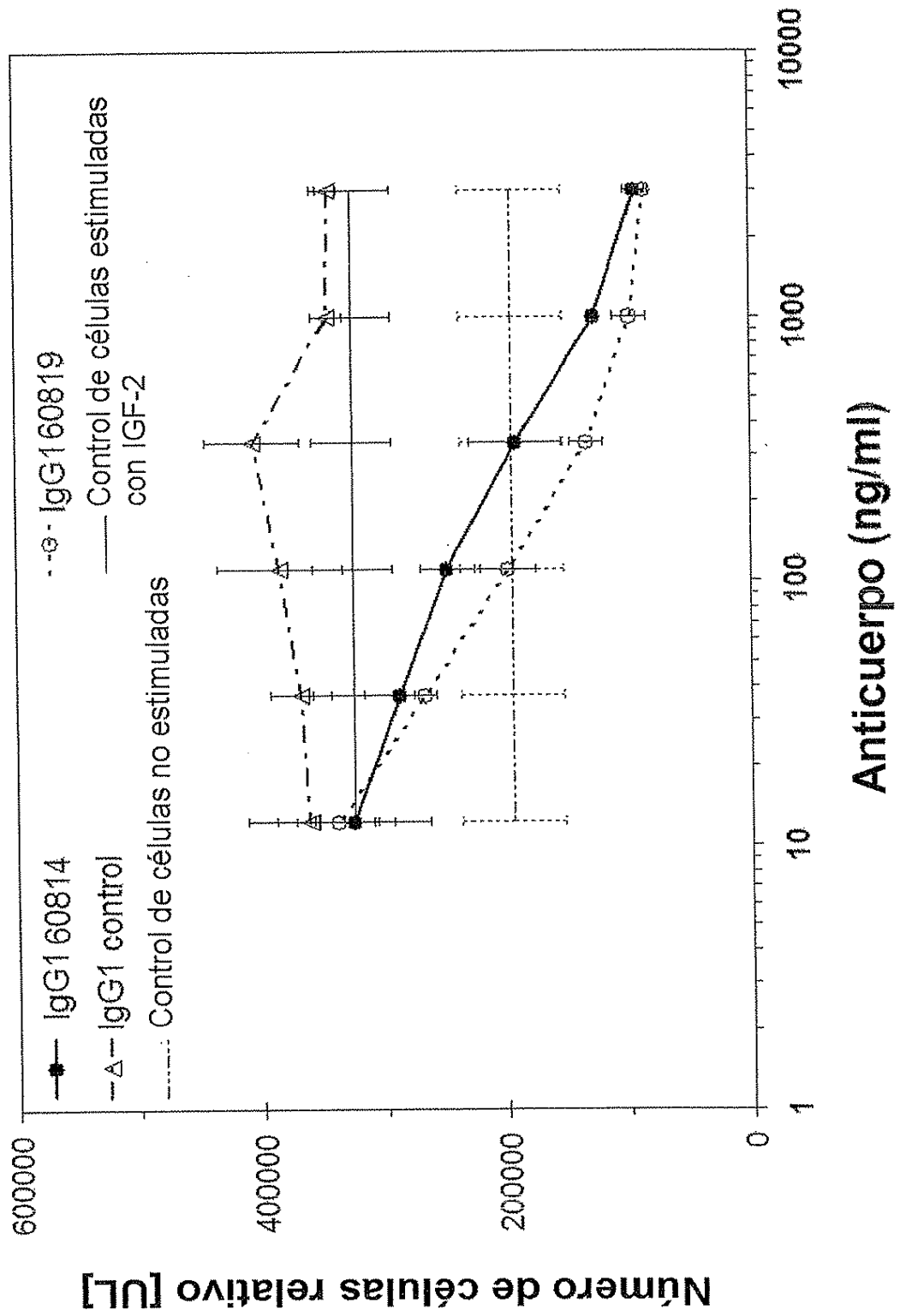


Fig. 4C

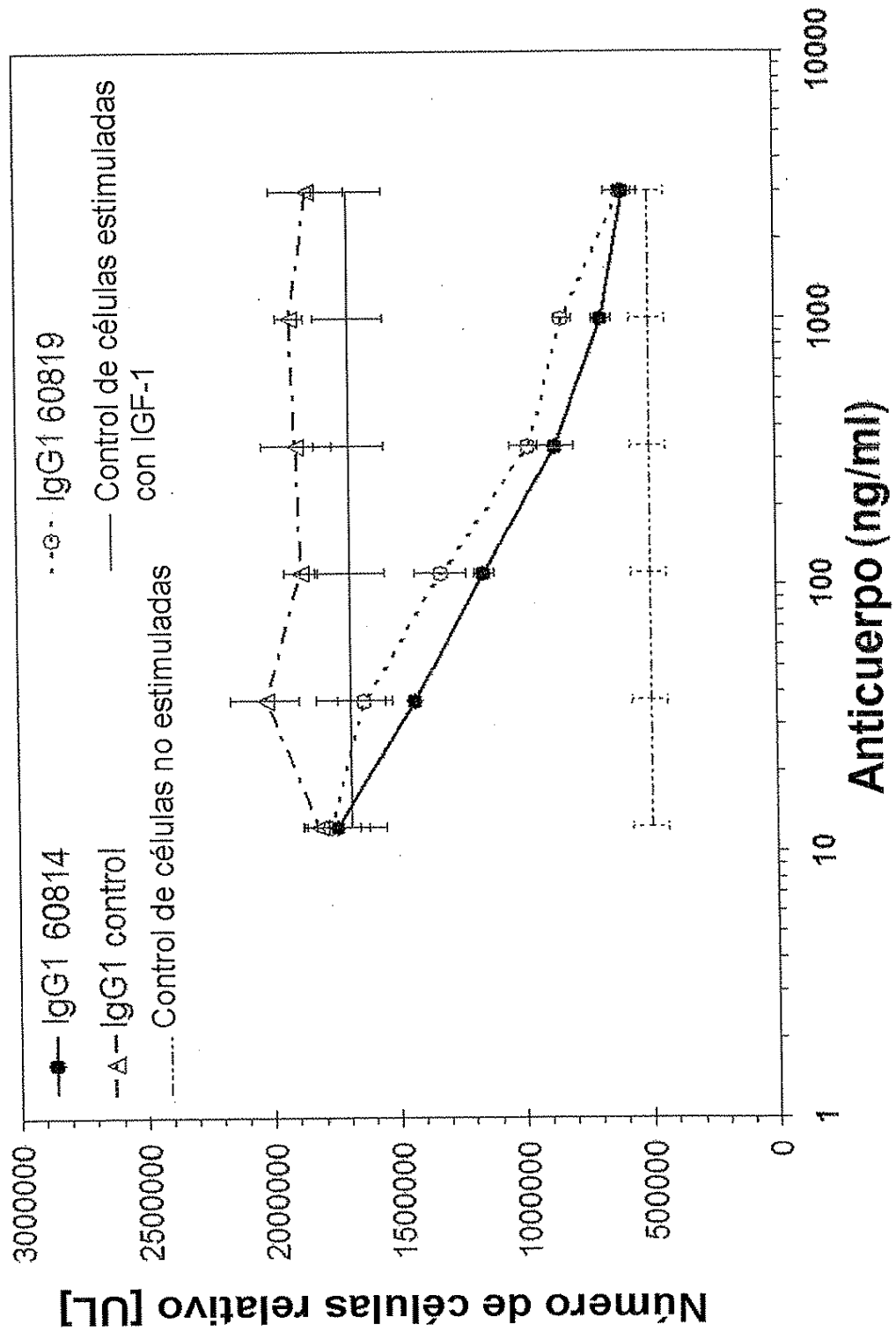


Fig. 4D

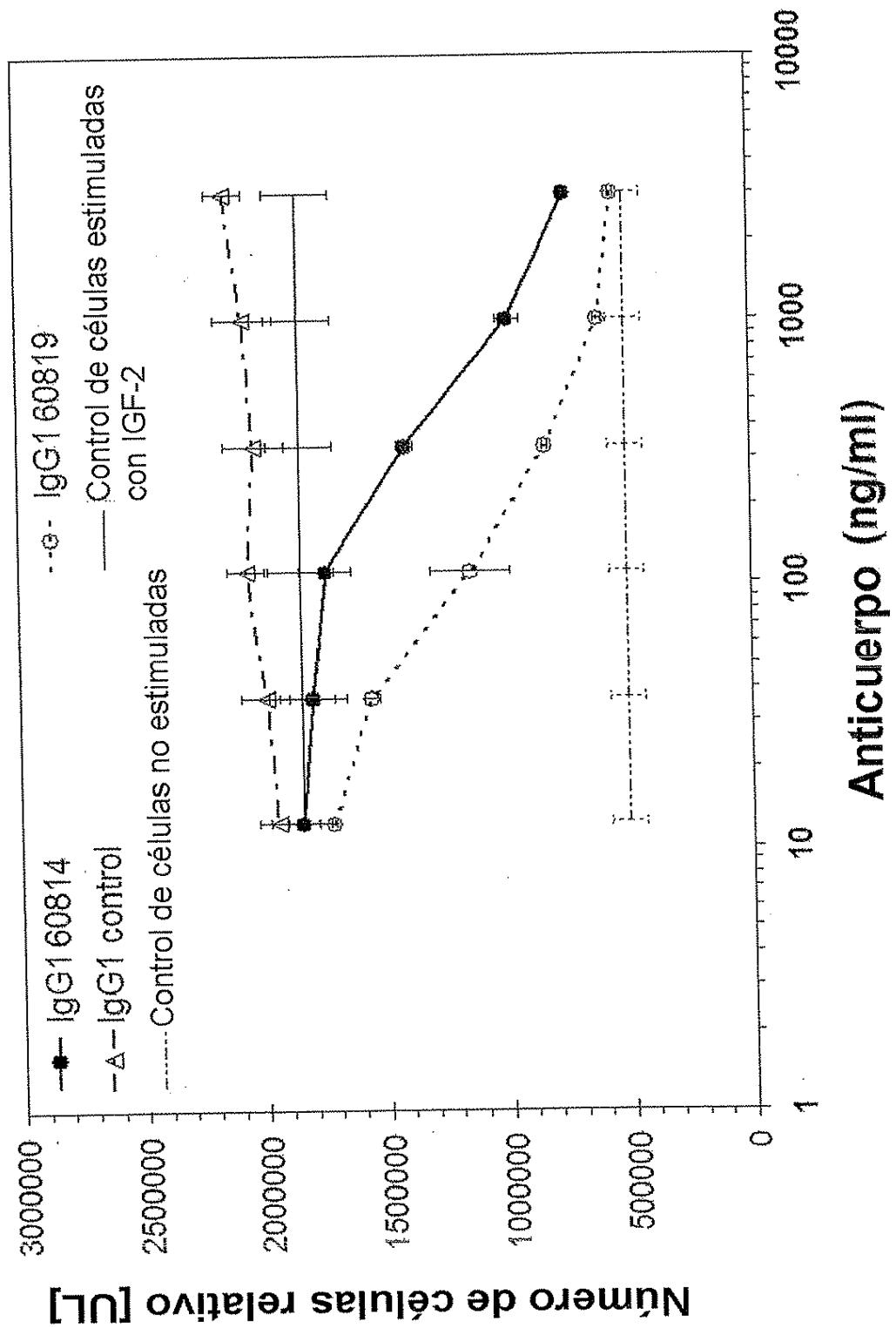


Fig. 5

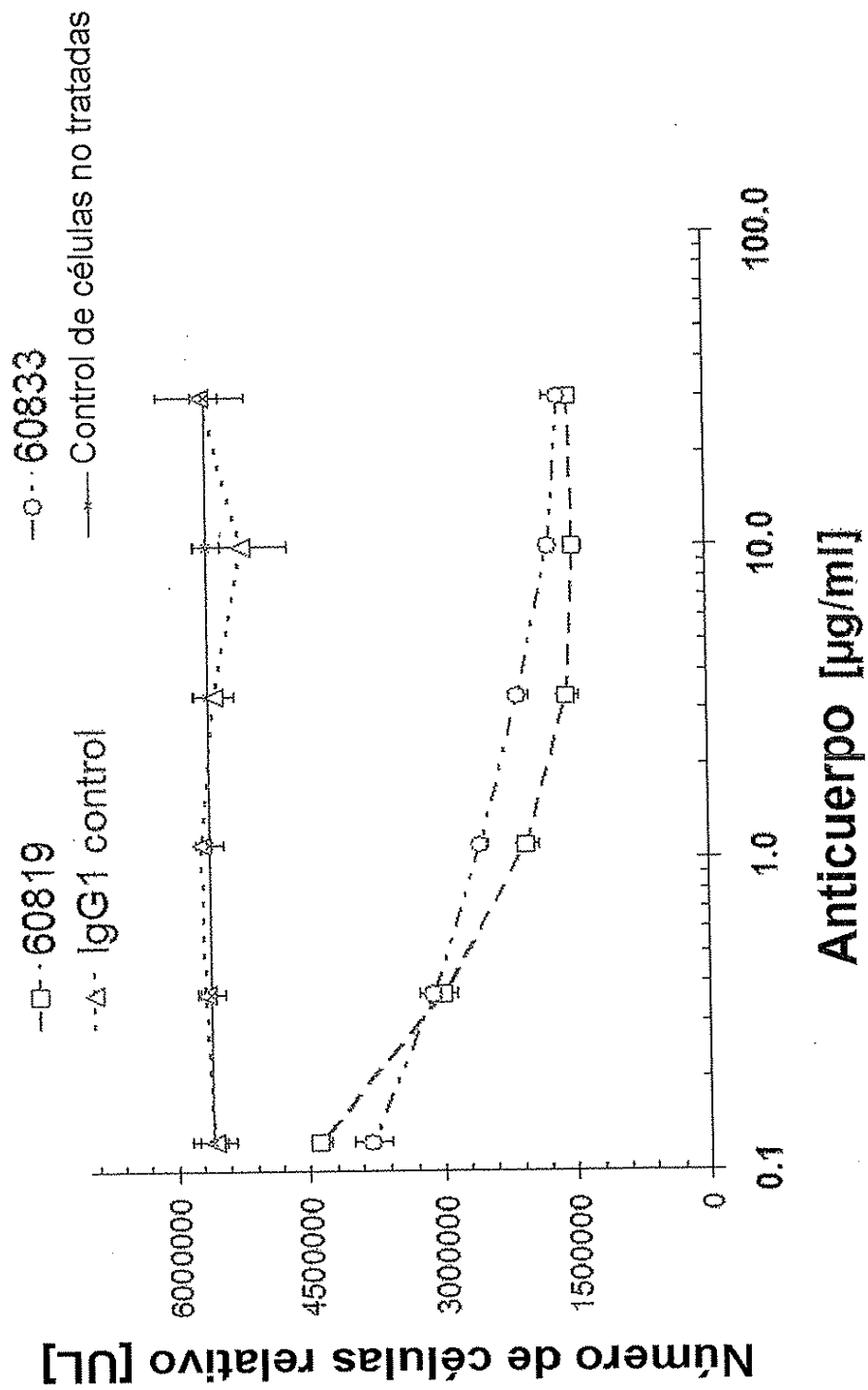


Fig. 6

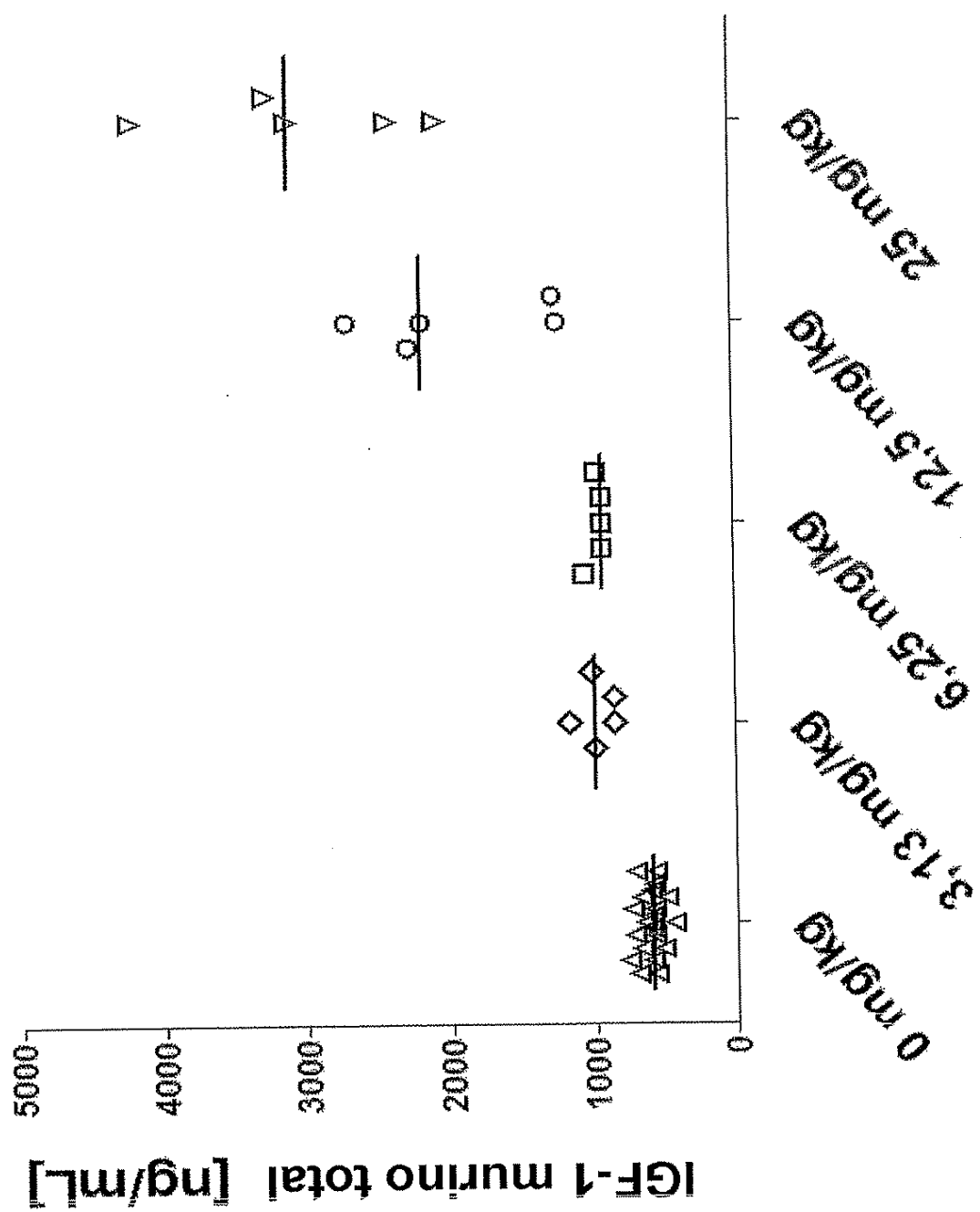


Fig. 7

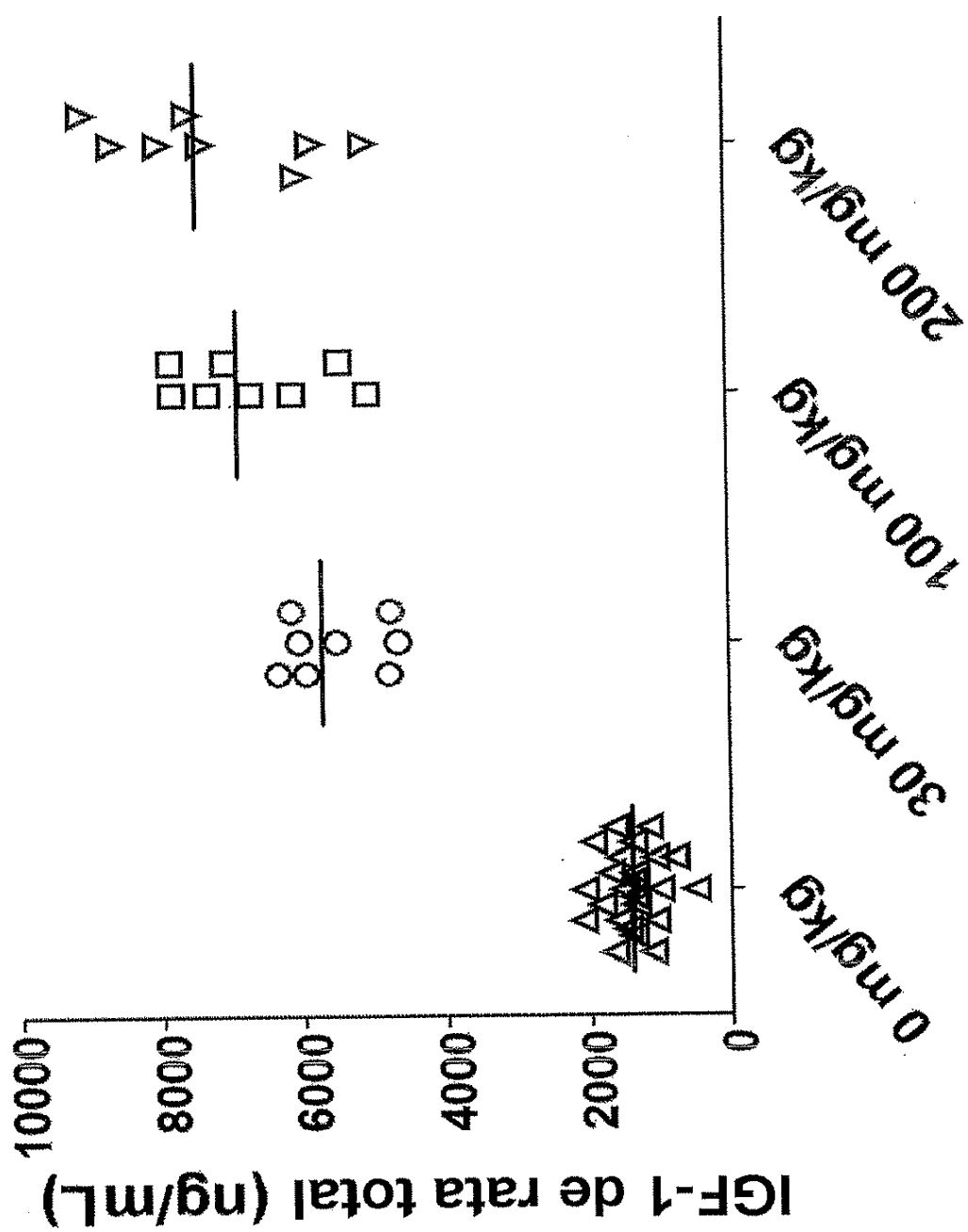


Fig. 8

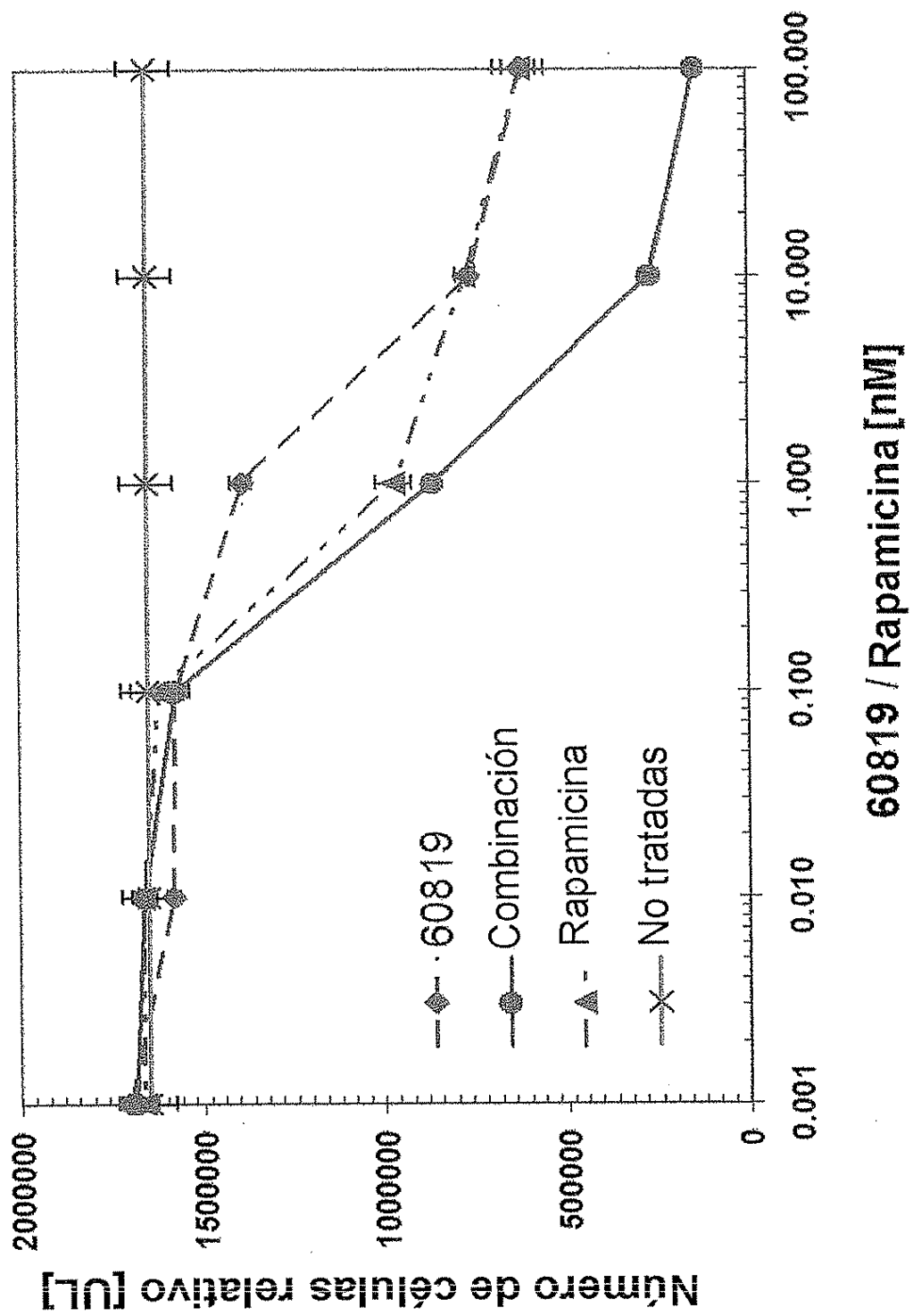


Fig. 9

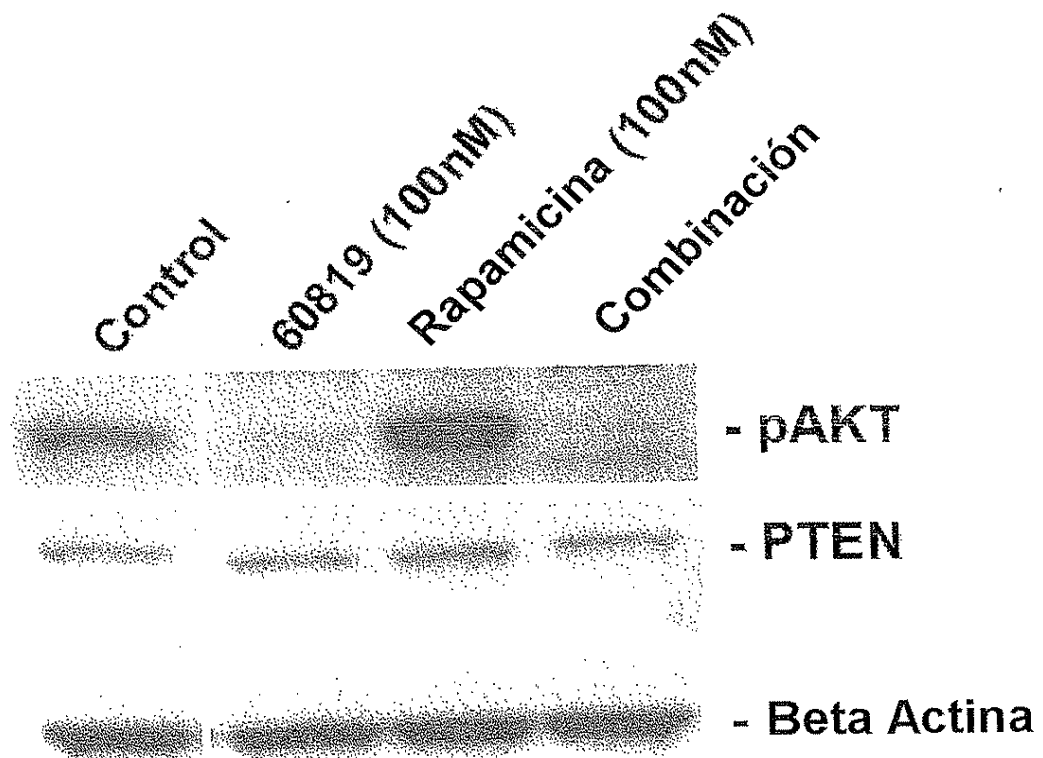


Fig. 10

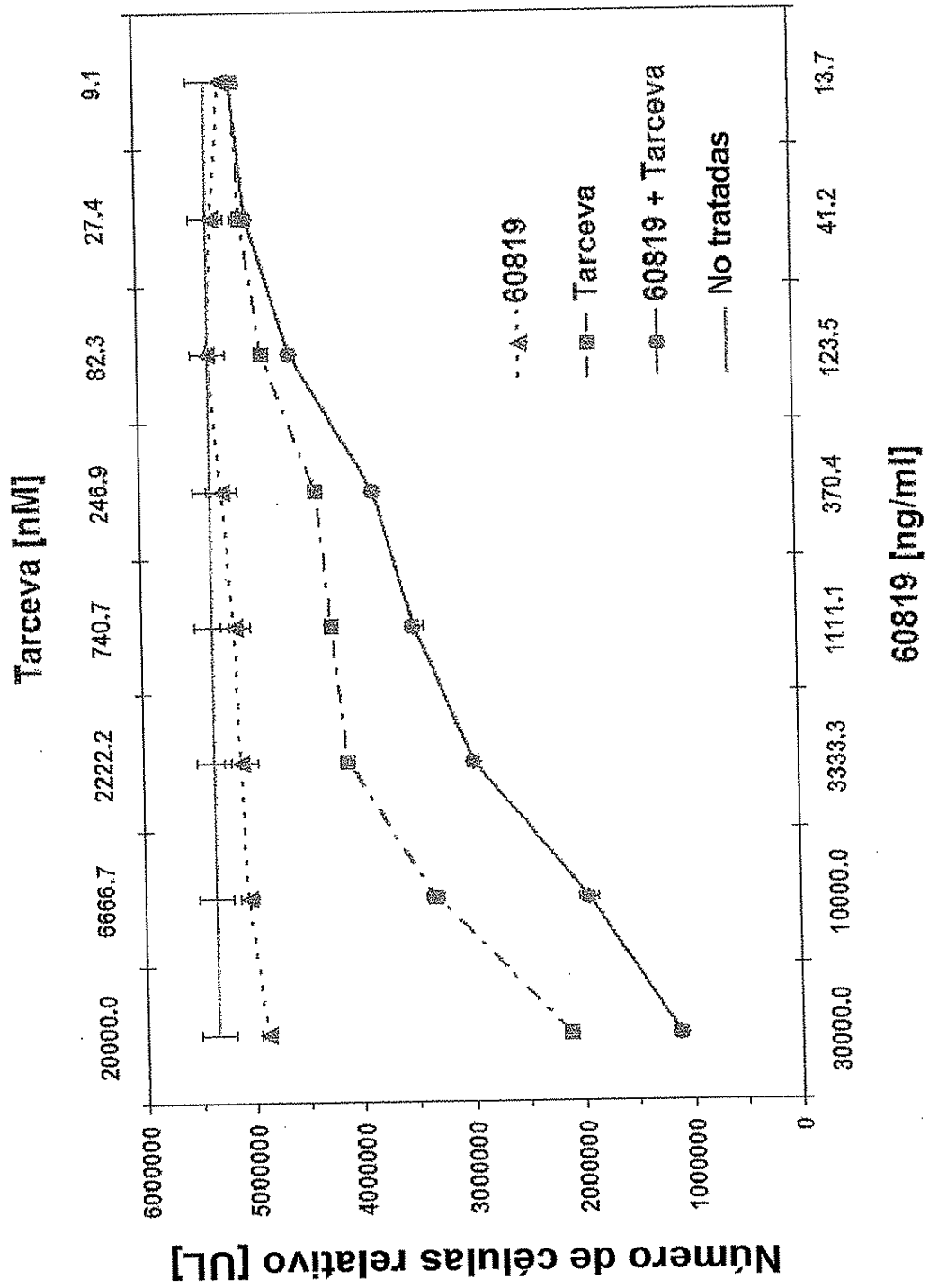
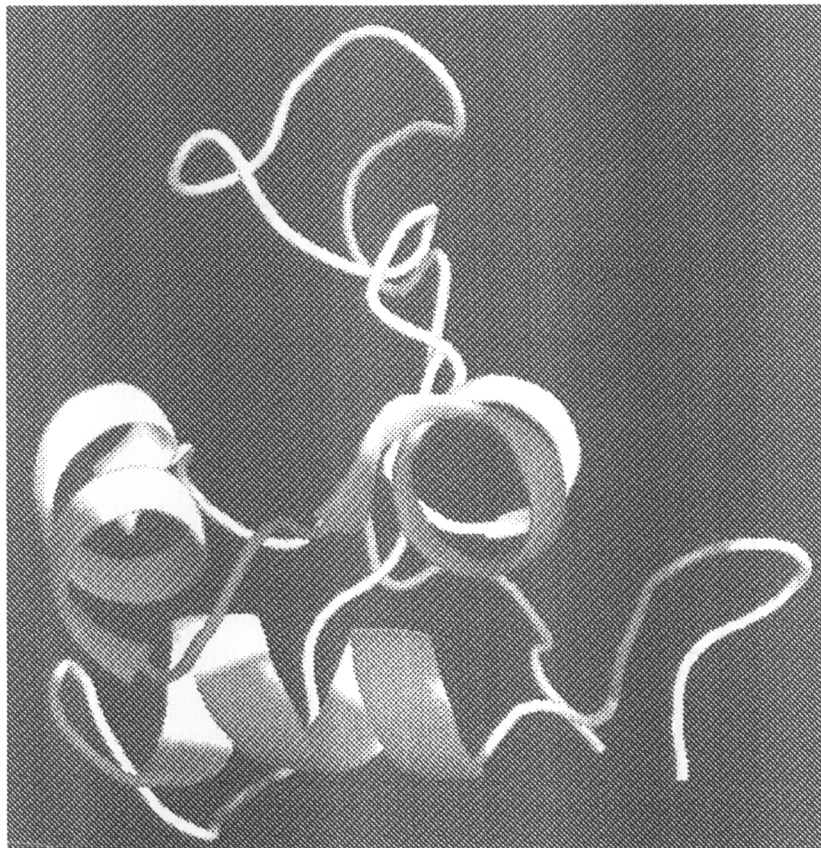


Fig. 11



GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

Fig. 12A

60814

Secuencia de aminoácidos de VH3:

QVELVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYWMHWVRQAPGKGLEWVSGISGWSWYIYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICARFCIDAYTKVFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ADN de VH3:

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTGCAACCGGGCGGACGCTGCCGTCTGAGCTGCGGGCCCTCCGGATT
TACCTTTTCTAATTATTGGATGCATTGGGTCCGCCAAGCCCTGGGAAGGCTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTT
GGCTAGCTGGACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGCGGTTTTTACCATTTCAGGTGATAATTTCGAAAAACA CCCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGGCGGTTTGGTATTGATGCTTATACTAAGGT
TTATTTTGATTATTGGGGCAAGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

60814

Secuencia de aminoácidos de Vλ3:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIPLKIVSWYQQKPGQAPVLIHDDNKRPSGIPERFSGSNSGN
TATLTISGTQAEDEADYYCSSWDTLDIENVFEGGTKLTVLG (Q)

Secuencia de ADN de Vλ3:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAACCGCGGTATCTCGTGTAGCGCGGATAATAT
TCCTCTTAAGTATGTTTCTTGTAACAGCAGAAACCCGGCAGCGCCAGTTCTTGTGATTCATGATGATAATAAGCGTC
CCTCAGGCATCCCGGAACGCTTAGCGGATCCAAACAGCGGCAACACCGGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAA
GACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATACTCTTGATATTTTAAATGTGTTTGGCGGCGCACGAAAGTTAACCGT
CCTAGGT

Fig. 12B

60819

Secuencia de aminoácidos de VH3:

QVELVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGETFSNYMHVVRQAPKGLEWVSGISGWSSWTYYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARFGIDAYTKVFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ADN de VH3:

CAGGTGGAATTGGTGAAGAAGCGGGCGGCCCTGGTGCAACCGGGCGGAGCCTGCGTCTGAGCTGCCGGCCCTCCGGATT
TACCTTTTCTAATTATTGGATGCATTGGTGCGCCCAAGCCCTGGGAAGGCTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTT
GGTCTAGCTGGACCTATTATGGGATAGCGTGAAAGCCGTTTACCATTTCACGTGATAATTGGAATAACACCCCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGGCTTTGGTATTGATGCTTATACTAAGGT
TTATTTTGATTATTGGGGCCCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

60819

Secuencia de aminoácidos de Vλ3:

DIELTQPPSVVAPGQTARISCSGDNPLKYVSWYQQKPGQAPVLVIHDDNKRPSGIPERFSGSNSGNTAILTIS
GTQAEDEADYYCQSYDYFPKFVVFGGTKLTVLG (Q)

Secuencia de ADN de Vλ3:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGGTATCTCGTGTAGCGCGGATAATAT
TCCTCTTAAGTATGTTCTTGTAACAGCAGAAACCCGGCAGGCGCCAGTCTTGTGATTCTATGATGATAATAAGCGTC
CCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGCGGGAA
GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGATTATTTTCTAAGTTTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGT
CCTAGGT

Fig. 12C

60833

Secuencia de aminoácidos de VH3:

QVELVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFTSYWMSWVRQAPGKGLELVSSITSYGSFTYYADSVKGRFTISRD
NSKNILYLQMNSLRAEDTAVYYCARNMYTHFDSWGQGILVTVSS

Secuencia de ADN de VH3:

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCCTGGTGCAACCGGCGGAGCCCTGCGTCTGAGCTGCGGGCCTCCGGATT
TACCTTTACTTCTTATTGGATGTC TTGGTGGCCCAAGCCCTGGGAAGGCTCTCGAGCTTGAGCTCTATCACTTCTT
ATGGTAGCTTTACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAAACACCCCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGGTAATAATGATATACTCATTTTGATTCCTTG
GGCCCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

60833

Secuencia de aminoácidos de Vλ3:

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNSVSWYQQLPGTAPKLLIYDNSKRPSGVDRFSGSKSGTSASLAI
TGLQSEDEADYYCQSRDITYGYWVFGGKLTVLG (Q)

Secuencia de ADN de Vλ3:

GATATCGTGTGACCCAGCCGCTTTCAGTGAGTGGCCGACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCGGCAGCAG
CAACATTGGTTCTAATTCTGTGCTTGTGTACCAAGAGTTGCCCGGACGGCGCCGAACTTCTGATTTATGATAATTCTA
AGCGTCCCTCAGGCGTCCCGGATCGTTTTCAGCGGATCCAAAAGCGGACCAAGCGGAGCCTTGGGATACGGGCTGCAA
AGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTCGTGATACTTATGGTTATTATTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTT
AACCGTCTCTAGGT