

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 656**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2006 E 15169743 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2960253**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos para quinasa-1 de tipo receptor de activina (ALK-1)**

30 Prioridad:

07.09.2005 US 715292 P

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

14.09.2018

73 Titular/es:

AMGEN FREMONT INC. (50.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US y
PFIZER INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

NORTH, MICHAEL AIDAN;
WANG, JIANYING;
WICKMAN, GRANT RAYMOND;
ZHANG, JINGCHUAN;
AMUNDSON, KARIN KRISTINA;
BEDIAN, VAHE;
BELOUSKI, SHELLEY SIMS;
HU-LOWE, DANA DAN;
JIANG, XIN;
KARLICEK, SHANNON MARIE;
KELLERMANN, SIRID-AIMEE y
THOMSON, JAMES ARTHUR

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 681 656 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 monoclonales humanos para quinasa-1 de tipo receptor de activina (ALK-1)

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales humanos y partes de unión a antígeno de los mismos que se unen al dominio extracelular (ECD) de quinasa-1 de tipo receptor de activina (ALK-1). La divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican dichos anticuerpos y partes de unión a antígeno, procedimientos para realizar anticuerpos anti-ALK-1 y partes de unión a antígeno, composiciones que comprenden estos anticuerpos y partes de unión a antígeno y procedimientos para usar los anticuerpos, partes de unión a antígeno y composiciones.

Antecedentes de la divulgación

ALK-1 es un receptor de superficie celular de tipo I para receptor de factor de crecimiento transformante beta de tipo 1 (TGF-beta-1). ALK-1 humana es un polipéptido de 503 aminoácidos, que incluye una secuencia señal (aminoácidos: 1-21), un dominio de unión a ligando de TGF-beta-1 extracelular N-terminal o ECD (aminoácidos: 22-118), un único dominio transmembrana (aminoácidos: 119-141), un dominio regulador rico en glicina/serina (GS) (aminoácidos: 142-202) y un dominio de serina-treonina quinasa C-terminal (202-492). La secuencia de aminoácidos de ALK-1 humana desvelada en Attisano y col. Cell, 1993, vol. 75, páginas 671-680 incluye Ser en la posición 172 (registro de GenBank L17075), mientras que la patente de Estados Unidos 6.316.217 reivindica la secuencia de aminoácidos de ALK-1 humana con Thr en la posición 172 (registro de Genbank NM_000020). El gen de ACVRL1 que codifica una ALK-1 humana de longitud completa desvelada en Attisano y col, está disponible en el mercado de Invitrogen Inc., Clon ID IOH21048. Aunque ALK-1 comparte el 60-80 % de homología global con otros receptores de tipo I (ALK-2 a ALK-7), ECD de ALK-1 es notablemente divergente de los ECD de otros miembros de la familia de ALK. Por ejemplo, en seres humanos, solamente ECD de ALK-2 está relacionado significativamente con ECD de ALK-1 (compartiendo aproximadamente el 25 % de identidad de aminoácidos). Patente de Estados Unidos 6.316.217; ten Dijke y col. Oncogene, 1993, vol. 8, páginas 2879-2887; Attisano y col. Cell, 1993, vol. 75, páginas 671-680.

En general, los ligandos de superfamilia de TGF-beta ejercen sus actividades biológicas mediante unión a complejos receptores heteroméricos de dos tipos (I y II) de serina/treonina quinasa. Los receptores de tipo II son quinasa constitutivamente activas que fosforilan receptor de tipo I tras unión a ligando. A su vez, las quinasa de tipo I activadas fosforilan corriente abajo las moléculas de señalización incluyendo los diversos Smad, que se translocan al núcleo y conducen a una respuesta transcripcional. Heldin y col. Nature, 1997, vol. 390, páginas 465-471. En el caso de ALK-1, los inventores han mostrado que Smad1 se fosforila específicamente y se transloca al núcleo en el que regula directamente la expresión de los genes sensibles a Smad1 Id1 y EphB2.

ALK-1 se expresa en gran medida y selectivamente en células endoteliales y otros tejidos altamente vascularizados tales como placenta o cerebro. Los inventores han mostrado por realización de perfiles de Affymetrix y RT-PCR en tiempo real que la expresión de ALK-1 en células endoteliales excede en gran medida la expresión de sus co-receptores activina de tipo II y endogлина, su ligando TGF-beta-1 o ALK-5. Las mutaciones en ALK-1 están asociadas con telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), lo que sugiere un papel crítico para ALK-1 en el control del desarrollo o reparación de vasos sanguíneos. Abdalla y col. J. Med. Genet, 2003, vol. 40, páginas 494-502; Sadick y col. Hematological/The Hematology J., 2005, vol. 90, 818-828. Además, dos estudios independientes de ratones knockout para ALK-1 proporcionan las pruebas *in vivo* clave para la función de ALK-1 durante la angiogénesis. Oh y col. Proc Nati Acad Sci USA, 2000, vol. 97, páginas 2626-2631; Urness y col. Nature Genetics, 2000, vol.26, páginas 328-331.

La angiogénesis es el proceso fisiológico que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y/o células madre endoteliales en circulación. Este es un proceso normal en el crecimiento y desarrollo, así como en la curación de heridas. Sin embargo, esto también es una etapa fundamental en la transición de tumores de un estado durmiente a un estado maligno. Hanahan y Folkman, "Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis," Cell, 86 (3):353-364, 1996; Carmeliet, "Angiogenesis in Health and Disease" Nature Medicine, 9(6):653-660, 2003; Bergers y Benjamin, "Tumoreigenesis and the Angiogenic Switch," Nature Reviews, 3:401-410, 2003. En enfermedades como cáncer, el cuerpo pierde la capacidad para mantener angiogénesis equilibrada. Nuevos vasos sanguíneos alimentan tejidos enfermos, destruyen tejidos normales, y en el caso de algunos cánceres, los nuevos vasos pueden permitir que las células tumorales escapen a la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis tumoral). Los inhibidores de angiogénesis, incluyendo anticuerpos monoclonales (mAb), son una clase muy prometedora de fármacos dirigidos contra este proceso anómalo para bloquear o ralentizar el crecimiento tumoral.

Además de un papel en el crecimiento de tumor sólido y metástasis, otras afecciones notables con un componente angiogénico son, por ejemplo, artritis, psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad neovascular y retinopatía diabética. Bonnet y col. "Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation," Rheumatology, 2005, vol. 44, páginas. 7-16; Creamer y col. "Angiogenesis in psoriasis," Angiogenesis, 2002, vol. 5, páginas. 231-236; Clavel y col.

“Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis,” *Joint Bone Spine*, 2003, vol. 70, páginas. 321-326; Anandarajah y col. “Pathogenesis of psoriatic arthritis,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2004, vol. 16, páginas 338-343; Ng y col. “Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration,” *Can. J. Ophthalmol.*, 2005, vol. 40, páginas 352-368; Witmer y col. “Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease,” *Progress in Retinal & Eye Research*, 2003, vol. 22, páginas 1-29; Adamis y col. “Angiogenesis and ophthalmic disease,” *Angiogenesis*, 1999, vol. 3, páginas 9-14.

Se espera que las terapias anti-angiogénicas sean crónicas en la naturaleza. En consecuencia, se prefieren dianas con función endotelial altamente selectiva, tales como ALK-1, para reducir el desgaste resultante de efectos secundarios. Además, dada la notable divergencia del ECD de ALK-1 de los ECD de otros miembros de la familia de ALK, se espera que los mAb inducidos contra el ECD de ALK-1 humana se dirijan selectivamente a ALK-1. Basándose en estas consideraciones, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de ALK-1 que puede inhibir la dimerización con el receptor de tipo II y por lo tanto bloquear la fosforilación de Smad1 y la respuesta transcripcional corriente abajo es altamente deseable.

R&D Systems, Inc. fabrica y vende un anticuerpo monoclonal anti-ALK-1 humana monoclonal (Cat. N° MAB370) producido a partir de un hibridoma resultante de la fusión de mieloma de ratón con linfocitos B obtenidos de un ratón inmunizado con dominio extracelular de ALK humana recombinante derivado de NSO purificado. Los inventores han mostrado que este anticuerpo no neutraliza la interacción entre ALK-1 y TGF-beta-1 ni anula la fosforilación de Smad1. Se ha generado antisueros de conejo contra un péptido sintético correspondiente a una parte de la región yuxtamembrana intracelular de ALK-1 (restos de aminoácidos 145-166), acoplada a hemocianina de lapa californiana (KLH) (patente de Estados Unidos 6.692.925) y contra el dominio extracelular de ALK-1 completo excepto para la secuencia principal (Lux y col., *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, páginas 9984-9992). Abdalla y col (Human Mol. Gen., 2000, vol. 9, páginas 1227-1237) presentan generación de un anticuerpo policlonal para ALK-1 usando una construcción de virus vaccinia recombinante. R&D Systems, Inc. fabrica y vende un anticuerpo anti-ALK-1 humana policlonal (Cat N° AF370) producido en cabras inmunizadas con dominio extracelular de ALK-1 humana recombinante, derivado de NSO purificado.

Hasta la fecha, no se han presentado anticuerpos monoclonales completamente humanos para el ECD de ALK-1, y nadie ha demostrado la eficacia de ningún anticuerpo monoclonal para el ECD de ALK-1 al anular la ruta de señalización de ALK-1/TGF-beta-1/Smad1.

Fernandez-L *et al*, "Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions", *Cardiovascular Research*, Volumen 68, N° 2, páginas 235-248 (5 de julio de 2005) trata de aislar y caracterizar células endoteliales en circulación de pacientes con HHT, y se refiere a MAB370 anti-ALK-1 en la 'Materials and Methods section' bajo los encabezamientos 'Western Blot analysis' e 'Immunofluorescent microscopy'.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención son como se definen por las reivindicaciones y en las siguientes realizaciones:

E1. Uso de un anticuerpo monoclonal neutralizante anti ALK-1 o una parte de unión a antígeno del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer hepatobiliar, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, mesotelioma o cáncer de la uretra en un ser humano que lo necesite, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios variables de cadena pesada y ligera, respectivamente, de las SEQ ID NO: 6 y 8; SEQ ID NO: 14 y 16; SEQ ID NO: 18 y 20; SEQ ID NO: 26 y 28; SEQ ID NO: 30 y 32; SEQ ID NO: 38 y 40; SEQ ID NO: 46 y 48; SEQ ID NO: 50 y 52; SEQ ID NO: 54 y 56; SEQ ID NO: 58 y 60; SEQ ID NO: 62 y 64; SEQ ID NO: 66 y 68; o SEQ ID NO: 70 y 72.

E3. Un anticuerpo monoclonal neutralizante anti ALK-1 o una parte de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer hepatobiliar, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, mesotelioma o cáncer de la uretra en un ser humano que lo necesite, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios variables de cadena pesada y ligera, respectivamente, de las SEQ ID NO: 6 y 8; SEQ ID NO: 14 y 16; SEQ ID NO: 18 y 20; SEQ ID NO: 26 y 28; SEQ ID NO: 30 y 32; SEQ ID NO: 38 y 40; SEQ ID NO: 46 y 48; SEQ ID NO: 50 y 52; SEQ ID NO: 54 y 56; SEQ ID NO: 58 y 60; SEQ ID NO: 62 y 64; SEQ ID NO: 66 y 68; o SEQ ID NO: 70 y 72.

E3. El uso según E1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno para uso según E2, en el que los dominios V_H y V_L del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprenden las siguientes secuencias, respectivamente: SEQ ID NO: 6 y 8; SEQ ID NO: 14 y 16; SEQ ID NO: 18 y 20; SEQ ID NO: 26 y 28; SEQ ID NO: 30 y 32; SEQ ID NO: 38 y 40; SEQ ID NO: 46 y 48; SEQ ID NO: 50 y 52; SEQ ID NO: 54 y 56; SEQ ID NO: 58 y 60; SEQ ID NO: 62 y 64; SEQ ID NO: 66 y 68; SEQ ID NO: 70 y 72; SEQ ID NO: 104 y 127; o la secuencia de aminoácidos de V_H codificada por la secuencia de nucleótidos del inserto hallado en el clon depositado con el número de referencia de ATCC PTA-6864 y la secuencia de aminoácidos de V_L codificada por la secuencia de nucleótidos del inserto hallado en el clon depositado con el número de referencia de ATCC PTA-6865.

E4. El uso según E1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E2, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8.

- E5. El uso según E1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E2, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera, respectivamente de SEQ ID NO: 2 y 4; SEQ ID NO: 100 y 102; SEQ ID NO: 2 y 102; o SEQ ID NO: 100 y 4.
- 5 E6. El uso según E1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E2, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 4.
- E7. El uso del anticuerpo según una cualquiera de E1, E3 y E4, o el anticuerpo para su uso según una cualquiera de E2-E4, en el que el anticuerpo es una molécula de IgG.
- 10 E8. El uso del anticuerpo según E7, o el anticuerpo para su uso según E7, en el que el anticuerpo es una molécula de IgG₁ o IgG₂.
- E9. El uso según una cualquiera de E1 y E3-E8, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de E2-E8, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno se derivatiza o se une con otra molécula.
- 15 E10. El uso según E9, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E9, en el que la molécula es un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, un péptido o una proteína.
- E11. El uso según una cualquiera de E1, E3-E5 y E7-E10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de E2-E5 y E7-E10, en el que el uso es en el tratamiento del carcinoma de células renales.
- 20 E12. El uso E6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E6, en el que el uso es en el tratamiento del carcinoma de células renales.
- E13. El uso según una cualquiera de E1, E3-E5 y E7-E10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de E2-E5 y E7-E10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer colorrectal.
- 25 E14. El uso según E6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E6, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer colorrectal.
- E15. El uso según una cualquiera de E1, E3-E5 y E7-E10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de E2-E5 y E7-E10, en el que el uso es en el tratamiento del mesotelioma.
- E16. El uso según E6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E6, en el que el uso es en el tratamiento del mesotelioma.
- 30 E17. El uso según una cualquiera de E1, E3-E5 y E7-E10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de E2-E5 y E7-E10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer de la uretra.
- E18. El uso según E6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según E6, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer de la uretra.
- 35 E19. El uso según una cualquiera de E1, E3-E5 y E7-E10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de E2-E5 y E7-E10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer hepatobiliar.
- La divulgación concierne a anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 neutralizantes aislados o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen a ALK-1 de primate, preferentemente el ECD de ALK-1 de primate, más preferentemente el ECD de ALK-1 humana. En un caso preferida, los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos monoclonales completamente humanos o partes de unión a antígeno de los mismos.
- 40 En otro aspecto, la presente divulgación es un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo anulando dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo la ruta de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. En un caso preferido, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos o partes de unión a antígeno de los mismos.
- 45 En otro aspecto, la presente divulgación es un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo siendo dicho anticuerpo parte de unión a antígeno del mismo un antagonista de la angiogénesis estimulada por TGF-beta-1. En un caso preferido los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos o partes de unión a antígeno de los mismos.
- 50 En otro aspecto, la presente divulgación es un anticuerpo completamente humano anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo siendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo un antagonista de angiogénesis tumoral estimulada por TGF-beta-1.
- 55 En otro aspecto, la presente divulgación es un anticuerpo anti-ALK-1 completamente humano inyectable bien tolerado o parte de unión a antígeno del mismo, siendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo un antagonista de angiogénesis estimulada por TGF-beta-1.
- En otro aspecto, la presente divulgación es un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo inhibiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo la regulación positiva de un gen diana corriente abajo específico de ALK-1, Id1. En un caso preferido, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos o partes de unión a antígeno de los mismos.
- 60 En otro aspecto, la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo describiéndose el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo con respecto a al menos una de varias propiedades funcionales como se describe más adelante.

Por ejemplo, en un caso, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une al dominio extracelular de ALK-1 de primate con un valor de avidéz de 1 μM o menos como se mide por resonancia de plasmón superficial. En un caso adicional, el anticuerpo o parte se une al dominio extracelular de ALK-1 de primate con un valor de avidéz de menos de 100 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM, menos de 500 pM, menos de 100 pM, menos de 50 pM, menos de 20 pM, menos de 10 pM, o menos de 1 pM, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En ciertos casos, el valor de avidéz es de 0,1 pM a 1 μM . En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 100 nM. En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 5 nM. En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 500 pM. En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 100 pM. En otros casos, la avidéz es de 1 pM a 10 pM.

En otro caso, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une al dominio extracelular de ALK-1 humana con un valor de avidéz de 100 nM o menos como se mide por resonancia de plasmón superficial. En un caso adicional, el anticuerpo o parte se une al dominio extracelular de ALK-1 humana con un valor de avidéz de menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM, menos de 500 pM, menos de 100 pM, menos de 50 pM, menos de 20 pM, menos de 10 pM o menos de 1 pM, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En ciertos casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 100 nM. En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 5 pM. En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 500 pM. En otros casos, el valor de avidéz es de 1 pM a 100 pM. En otros casos, la avidéz es de 1 pM a 10 pM.

En otro caso, el anticuerpo o parte del mismo tiene una tasa de disociación (k_{off}) para ALK-1 humana de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menor como se mide por resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, en ciertos casos el anticuerpo o parte tiene una k_{off} para ALK-1 humana de menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} o menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. En otros casos, la k_{off} es de 10^{-6} s^{-1} a 10^{-4} s^{-1} . En otros casos, la k_{off} es de 10^{-6} s^{-1} a $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

En otro caso, el anticuerpo o parte del mismo se une a ALK-1 de primate con una K_D de 1000 nM o menos. En un caso adicional, el anticuerpo o parte se une a ALK-1 humana con una K_D de menos de 500 nM, menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 20 nM, menos de 10 nM, o menos de 1 nM, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En ciertos casos, la K_D es de 1 μM a 100 nM. En otros casos, la K_D es de 100 nM a 10 nM. En otros casos, la K_D es de 50 nM a 0,1 nM. Dichos valores de K_D pueden medirse por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, tal como por ELISA, RIA, citometría de flujo o resonancia de plasmón superficial, tal como BIACORE™.

En otro caso, el anticuerpo o parte del mismo tiene una mayor afinidad de unión por ALK-1 de primate ($K_D(\text{P})$) que por ALK-1 de roedor ($K_D(\text{R})$). En un caso, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación tienen una $K_D(\text{R})/K_D(\text{P})$ que es mayor de o igual a 1,5. En un caso adicional, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación tienen una $K_D(\text{R})/K_D(\text{P})$ que es mayor de o igual a 2, mayor de o igual a 3, mayor de o igual a 5, mayor de o igual a 10, mayor de o igual a 20, mayor de o igual a 50, mayor de o igual a 100, mayor de o igual a 200, mayor de o igual a 500, o mayor de o igual a 1000. Dichos valores de K_D tanto para ALK-1 de primate como para ALK-1 de roedor puede medirse por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, tal como por citometría de flujo, ELISA, RIA o resonancia de plasmón superficial, tal como BIACORE™.

En otro caso, el anticuerpo anti-ALK o parte del mismo tiene una CI_{50} de 500 nM o menos como se mide por su capacidad para inhibir la regulación positiva de un gen diana corriente abajo específico de ALK-1, Id1. En un caso adicional, dicha CI_{50} es menor de 300 nM, menor de 200 nM, menor de 150 nM, menor de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 20 nM, menor de 10 nM, o menor de 1 nM. En ciertos casos, la CI_{50} es de 1 nM a 500 nM. En otros casos, la CI_{50} es de 5 nM a 250 nM. En otros casos, la CI_{50} es de 10 nM a 100 nM.

En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo tiene una CI_{50} de 250 nM o menos como se mide por su capacidad para inhibir la fosforilación de Smad1 determinada por transferencia de Western usando sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey. En un caso adicional, dicha CI_{50} es menor de 200 nM, menor de 150 nM, menor de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 20 nM, menor de 10 nM o menor de 1 nM. En ciertos casos, la CI_{50} es de 1 nM a 250 nM. En otros casos, la CI_{50} es de 5 nM a 200 nM. En otros casos, la CI_{50} es de 10 nM a 100 nM.

En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que están implantadas de forma intradérmica células tumorales M24met de melanoma humano como se determina por análisis de IHC de ensayo de señal CD-31 humana en al menos el 40 % en comparación con una muestra de control. En un caso adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que están implantadas de forma intradérmica células tumorales M24met de melanoma humano en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 % o al menos el 60 % en comparación con una muestra de control.

En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo tiene una CE_{50} de 500 nM o menos como se mide por su capacidad para inhibir la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que están implantadas de forma transdérmica células tumorales M24met de melanoma humano. En un caso adicional, dicha CE_{50} es menor de 400 nM, menor de 300 nM, menor de 200 nM, menor de 150 nM, menor

de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 25 nM, o menor de 5 nM. En ciertos casos, la CE_{50} es de 5 nM a 500 nM. En otros casos, la CI_{50} es de 25 nM a 300 nM. En otros casos, la CI_{50} es de 50 nM a 150 nM.

5 En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que están implantadas de forma transdérmica una mezcla de células endoteliales macrovasculares humanas más colágeno como se determina por análisis de IHC de ensayo de señal CD-31 humana en al menos un 25 % en comparación con una muestra de control. En un caso adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que está implantado de forma transdérmica colágeno en al menos 50 %
10 en comparación con una muestra de control. En un caso adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % en comparación con el control.

15 En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo compite por la unión con ALK-1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1, 1.12.1, 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1, 1.14.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.183.1, 1.27.1, 1.29.1, 1.31.1; 1.8.1, 1.9.1, 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1; 5.57.1 y 5.59.1.

20 En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo compite de forma cruzada por la unión con ALK-1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1; 1.121; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1, 1.14.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.183.1, 1.27.1, 1.29.1, 1.31.1; 1.8.1, 1.9.1, 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1; 5.57.1 y 5.59.1.

25 En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo se une al mismo epítipo de ALK-1 que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1, 1.12.1, 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1, 1.14.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.183.1, 1.27.1, 1.29.1, 1.31.1, 1.8.1, 1.9.1, 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1 y 5.59.1.

30 En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo se une a ALK-1 con sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1, 1.12.1, 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1, 1.14.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.183.1, 1.27.1, 1.29.1; 1.31.1, 1.8.1, 1.9.1, 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5.56.1, 5.57.1, y 5.59.1.

35 En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo se une a ALK-1 sustancialmente con la misma k_{off} que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1, 1.12.1, 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1, 1.14.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.183.1, 1.27.1, 1.29.1, 1.31.1, 1.8.1, 1.9.1, 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1, y 5.59.1.

40 Un aspecto adicional de la presente invención es un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas anteriormente, y comprende un dominio V_H que es al menos un 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104. En una realización, dicho dominio V_H es al menos el 91 %, al menos el 93 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104.

45 En un caso adicional, el anticuerpo o parte del mismo tiene al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y comprende un dominio V_H que es cualquiera de SEQ ID NO 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o difieren de una cualquiera de SEC ID N °: 6; 10; 14; 18; 26; 30; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, por tener al menos una sustitución de aminoácido conservativa. Por ejemplo, el dominio V_H puede diferir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104. En un caso adicional, cualquiera de estas sustituciones de aminoácidos conservativas puede producirse en las regiones CDR1, CDR2 y/ o CDR3.

50 Un aspecto adicional de la presente divulgación es un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo como se reivindica con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y comprende un dominio V_L que es al menos un 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127. En un caso, dicho dominio V_L es al menos el 91 %, al menos el 93 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127.

55 En un caso adicional, el anticuerpo o parte del mismo tiene al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y comprende un dominio V_L que es uno cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, o difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127 por tener al menos una sustitución de aminoácido conservativa. Por ejemplo, el dominio V_L puede diferir en 1, 2, 3, 4, 5, 8, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 62; 56; 60;

64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127. En un caso adicional, cualquiera de estas sustituciones de aminoácidos conservativas puede producirse en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3.

Otro aspecto de la presente invención es un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo como se reivindica con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente en el que los dominios V_L y V_H son cada uno al menos un 90 % idénticos en secuencia de aminoácidos a los dominios V_L y V_H , respectivamente, de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1. Por ejemplo, los dominios V_L y V_H son cada uno al menos, el 91 %, 93 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % idénticos en secuencias de aminoácidos a los dominios V_L y V_H , respectivamente, de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

En otro aspecto de la presente divulgación hay un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo que se selecciona del grupo que consiste en: a) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 6, y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 8; b) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 10 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 12; c) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 14 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 16; d) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 18 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 20; e) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 22 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 24; f) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 26 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 28; g) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 30 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 32; h) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 34 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 36; i) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 38 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 40; j) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 42 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 44; k) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 46 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 48; l) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 50 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 52; m) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 54 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 56; n) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 58 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 60; o) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 62 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 64; p) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 66 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 68; q) un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 70 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 72; r) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 74 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 76; s) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 78 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 80; t) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 82 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 84; u) un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 86 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 88; v) un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 90 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 22; w) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 104 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 127; x) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 6 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 127; y y) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 104 y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 8.

En un caso adicional, para cualquiera de los anticuerpos o partes del mismo como se ha descrito anteriormente en los grupos a) a v) los dominios V_H y/o V_L pueden diferir de las SEQ ID NO específicas enumeradas en los mismos por al menos una sustitución de aminoácidos conservativa. Por ejemplo, los dominios V_H y/o V_L pueden diferir de las SEQ ID NO enumeradas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas. En un caso adicional, cualquiera de estas sustituciones de aminoácidos conservativas puede producirse en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3.

En otro caso, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en el que el dominio V_H se selecciona independientemente de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID N°: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, en al menos una sustitución de aminoácidos conservativa y el dominio V_L se selecciona independientemente de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID N°: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, en al menos una sustitución de aminoácidos conservativa. Por ejemplo, los dominios V_H y V_L pueden diferir cada uno de SEQ ID

NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, y 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, respectivamente, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas.

5 En un caso adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en el que dicho anticuerpo o parte comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H seleccionadas independientemente de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, respectivamente, halladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, en al menos una sustitución de aminoácido conservativa. Por ejemplo, las CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H pueden diferir de las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas.

15 En un caso adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en el que dicho anticuerpo o parte comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L seleccionadas independientemente de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, respectivamente, halladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, en al menos una sustitución de aminoácido conservativa. Por ejemplo, las CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L pueden diferir de las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas.

25 La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, comprendiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno la CDR1 de V_H y V_L , la CDR2 de V_H y V_L , y la CDR3 V_H y V_L como se encuentra en uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D18A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

30 La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, comprendiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno una cadena pesada que usa un gen de V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59 humano. En algunos casos, la cadena pesada usa un gen V_H 3-33 humano, un gen D6-19 humano y un gen J_H 3B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-61 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D 3-22 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 3-15 humano, un gen D 3-22 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 5-12 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 4-23 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 2-2 humano y un gen J_H 5B humano; un gen V_H 4-31 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 3-15 humano, un gen D 1-1 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D 3-10 humano y un gen J_H 6B humano; o un gen V_H 3-11 humano, un gen D 6-6 humano y un gen J_H 6B humano.

45 La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno comprende una cadena ligera que usa un gen de V_K A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K Bk, V_K L1 o V_K L2 humano. En algunos casos, la cadena ligera usa un gen V_K L1 humano y un gen J_K 4 humano; un gen V_K A27 humano y un gen J_K 5 humano o un gen J_K 4 humano; un gen V_K B3 humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K L2 humano y un gen J_K 3 humano; un gen V_K humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K A3 humano y un gen J_K 4 humano; un gen V_K A1 humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K B2 humano y un gen J_K 4 humano; o un gen V_K A2 humano y un gen J_K 1 humano.

55 La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo con al menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, comprendiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno una o más de una secuencia de aminoácidos FR1, FR2, FR3 o FR4 de cadena pesada y/o cadena ligera como se encuentra en uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1 y 5.59.1.

60 La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en: a) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID N°: 4; b) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID N°: 102; c) SEQ ID NO: 100 y SEQ ID N°: 4; y d) SEQ ID N°: 100 y SEQ ID NO: 102.

En un caso adicional de la presente divulgación está cualquiera de los anticuerpos descritos previamente que es una molécula de IgG, IgM, IgE, IgA o IgD, o deriva de las mismas. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser una IgG₁ o IgG₂.

5 Otro caso proporciona cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno descritos anteriormente que es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento F_v, un fragmento F_v de cadena sencilla, un fragmento V_H de cadena sencilla, un fragmento V_L de cadena sencilla, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo biespecífico.

10 En un caso adicional hay un anticuerpo derivatizado o parte de unión a antígeno que comprende cualquiera de los anticuerpos o partes de los mismos como se ha descrito previamente y al menos una entidad molecular adicional. Por ejemplo, la al menos una entidad molecular adicional puede ser otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un marcador, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o un marcador de polihistidina). Por ejemplo, los agentes de detección útiles con los que puede derivatizarse un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la divulgación incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonil, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para detección, tales como peroxidasa de rábano rústico, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. En un caso adicional los anticuerpos o partes de los mismos de la presente divulgación también pueden marcarse con biotina o con un epítopo polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores epitópicos). En un caso adicional más de la presente divulgación cualquiera de los anticuerpos o partes de los mismos también pueden derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo de carbohidrato.

15 En algunos casos, los anticuerpos anti-ALK-1 o partes de unión a antígeno desvelados en el presente documento están unidos a un soporte sólido.

En algunos casos, la lisina C-terminal de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación se escinde. En diversos casos de la divulgación, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-ALK-1 pueden incluir adicionalmente una secuencia señal.

20 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos reivindicados o partes de unión a antígeno de los mismos como se han descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En otro caso, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos como se describe en el presente documento. En un caso particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO 1, codificando dicha secuencia una cadena pesada. En otro caso particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3, codificando dicha secuencia una cadena ligera.

30 En otro caso particular una molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que comprende una fase abierta de lectura de la secuencia de ADNc de un clon depositado con un número de referencia de ATCC PTA-6864. En otro caso particular una molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que comprende una fase abierta de lectura de la secuencia de ADNc de un clon depositado con un número de referencia de ATCC PTA-6865.

35 En otro caso particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 95 o 128, codificando cada una de dichas secuencias una cadena pesada. En otro caso particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 101, codificando cada una de dichas secuencias una cadena ligera.

La divulgación se refiere además a un vector que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, comprendiendo el vector opcionalmente una secuencia de control de la expresión ligado operativamente a la molécula de ácido nucleico.

40 Otro caso proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento o que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. La presente divulgación también proporciona una línea celular aislada que produce cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno como se describe en el presente documento o que produce la cadena pesada o cadena ligera de cualquiera de dichos anticuerpos o dichas partes de unión a antígeno.

45 En otro caso, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar cualquiera de las células huésped o líneas celulares descritas en el presente documento en condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno.

La presente divulgación también se refiere a un animal transgénico no humano o planta transgénica que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, expresando el animal transgénico no humano o planta transgénica dicho ácido nucleico.

5 La presente divulgación proporciona además un procedimiento para aislar un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une a ALK-1, que comprende la etapa de aislar el anticuerpo del animal transgénico no humano o planta transgénica como se describe en el presente documento.

En otro caso, la divulgación se refiere a un hibridoma depositado con un número de referencia de ATCC de PTA-6808.

10 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para determinar si una sustancia inhibe la regulación positiva de un gen diana corriente abajo específico de ALK-1, Id1, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una primera muestra de células que expresan Id1 con la sustancia y determinar si se inhibe la expresión de Id1, en el que un nivel reducido de la expresión Id1 en la primera muestra de células puestas en contacto con la sustancia en comparación con una muestra de control de células es indicativo de que dicha sustancia inhibe la expresión de Id1. La presente divulgación proporciona además el procedimiento, en el que la sustancia es un anticuerpo que se une al dominio extracelular de ALK-1.

15 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para tratar crecimiento celular anómalo en un mamífero que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, o cualquiera de las composiciones farmacéuticas, como se describe en el presente documento. La presente divulgación proporciona además un procedimiento para tratar el crecimiento celular anómalo en un mamífero que lo necesite con un anticuerpo o parte de unión a antígeno de los mismos que se une a ALK-1 que comprende las etapas de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento en condiciones adecuadas que permitan la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico. En otro caso, el procedimiento de tratar crecimiento celular anómalo comprende además administrar una cantidad de una o más sustancias seleccionadas de agentes anti-tumorales, agentes anti-angiogénesis, inhibidores de traducción de señal y agentes antiproliferativos, siendo dichas cantidades juntas eficaces en el tratamiento de dicho crecimiento celular anómalo. En casos particulares, dicho crecimiento celular anómalo es canceroso.

20 La presente divulgación también proporciona una proteína ALK-1 de mono Cynomolgus aislada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. La presente divulgación proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. La presente divulgación proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada de SEQ ID NO: 94.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de datos de unión de epítomos. El anticuerpo 1.12.1 (M29I/D19A) se inyectó durante 10 minutos seguido de una segunda inyección de 10 minutos del anticuerpo 1.12.1 (M29I/D19A). Esto define la respuesta máxima para una inyección de 20 minutos de ese anticuerpo. La respuesta máxima a inyección de 20 minutos se determinó de forma similar para el anticuerpo 1.27.1. El anticuerpo 1.12.1 (M29I/D19A) se inyectó durante 10 minutos seguido de una inyección de 10 minutos del anticuerpo 1.27.1. Si la respuesta total queda entre las respuestas máximas definidas entonces los dos anticuerpos deben unirse al mismo epítopo. Si la respuesta total excede la mayor respuesta máxima entonces los anticuerpos deben unirse a diferentes epítomos. El experimento se repitió con el orden de inyecciones invertido como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 2 muestra alineamiento de secuencias de proteínas ALK-1 humanas y de Cyno.

La Figura 3 muestra la determinación de K_D de la unión del anticuerpo 1.12.1 recombinante a ALK-1 de superficie celular. (a) Humano. (b) Cyno.

1.12.1 (rWT) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado.

45 1.12.1 (M29I/D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía dos mutaciones de aminoácidos específicas (metionina en la posición 29 en la cadena pesada reemplazada con isoleucina y ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera reemplazado con alanina).

1.12.1 (M29I) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una única mutación de aminoácido específica en la que la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplazó con isoleucina.

50 1.12.1 (D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una única mutación de aminoácido específica en la que ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera se reemplazó con alanina.

La Figura 4 muestra ejemplos de valoraciones de ID1 usando Ensayo de Taqman ID1 para las variantes del anticuerpo 1.12.1.

1.12.1 se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que se aisló a partir del hibridoma.

1.12.1 (rWT) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado.

60 1.12.1 (M29I/D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía dos mutaciones de aminoácidos específicas (metionina en la posición 29 en la cadena pesada reemplazada con isoleucina y ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera reemplazado con alanina).

1.12.1 (M291) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una única mutación de aminoácido específica en la que la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplazó con isoleucina.

1.12.1 (D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una mutación de un único aminoácido específica en la que el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera se reemplazó con alanina.

La Figura 5 muestra ejemplos de valoraciones de ID1 usando Ensayo de Taqman ID1 para las variantes de secuencia del anticuerpo 1.12.1 y el derivado Fab.

1.12.1 se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que se aisló a partir del hibridoma.

1.12.1 (rWT) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado.

1.12.1 (M291) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una mutación de un único aminoácido específica en la que la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplazó con isoleucina.

1.12.1 (D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una mutación de un único aminoácido específica en la que el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera se reemplazó con alanina.

1.12.1 (M291/D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía dos mutaciones de aminoácidos específicas (metionina en la posición 29 en la cadena pesada reemplazada con isoleucina y ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera reemplazado con alanina).

Fab 1.12.1 (M291/D19A) se refiere al fragmento Fab de mAb 1.12.1(M291/D19A) preparado digiriendo IgG1 1.12.1(M291/D19A) usando papaína.

La Figura 6 muestra internalización de ALK-1. (a) Supervisión del anticuerpo neutralizador que permanece en la superficie celular. (b) Supervisión del receptor de superficie celular restante ALK-1.

La Figura 7A muestra alineamiento de secuencias de dominio variable para anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación, con secuencias de línea germinal. Las mutaciones comparadas con línea germinal están en negrita. Las secuencias de CDR están subrayadas. La Figura 7B muestra alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas de dominios variables de cadena ligera para anticuerpos anti-ALK-1 1.12.1, 1.14.1, 1.162.1, 1.31.1, 4.62.1 y 4.72.1 con la secuencia de V_{κ} de A27 de línea germinal. Las Figuras 7C y 7D muestran alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas de dominios variables de cadena ligera pesada para anticuerpos anti-ALK-1 1.12.1, 1.151.1., 1.162.1, 1.8.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1 y 5.34.1 con la secuencia V_H 4-31 de línea germinal humana.

La Figura 8 muestra un ejemplo del análisis histológico (tinción H y E) de una sección de la piel humana injertada después de cirugía.

La Figura 9 (A) muestra la tinción tricrómica de colágeno en un ratón quimérico para piel humana.

La Figura 9 (B) la detección de vasos humanos en el gel de colágeno implantado en un ratón quimérico para prepucio humano. Texas-red: vasos humanos. FITC: vasos de ratón. Amarillo: co-tinción.

La Figura 10 muestra una imagen inmunofluorescente de vasos humanos (rojo) y de ratón (verde) del tumor M24met en el ratón quimérico SCID para prepucio humano.

La Figura 11 muestra la imagen de IHC de vasos humanos (marrones) del tumor M24met en el ratón SCID quimérico para prepucio humano.

La Figura 12 muestra las imágenes inmonofluorescentes representativas de vasos humanos (rojo) y de ratón (verde) de los tumores M24met tratados (10 mg/kg) con anticuerpo 1.1.2.1 (M291/D19A) y el control en el ratón SCID quimérico para prepucio humano.

La Figura 13 muestra la inhibición dependiente de dosis de crecimiento de vasos tumorales humanos por el anticuerpo 1.12.1 (M291/D19A) en el modelo de ratón SCID quimérico para prepucio humano.

La Figura 14 muestra la concentración en plasma de ratón SCID del anticuerpo 1.12.1 (M291/D19A).

La Figura 15 muestra la CE_{50} estimada para el anticuerpo 1.12.1 (M291/D19A) en el modelo de quimera de SCID para prepucio con M24met. El valor de control al 100 % se dio a una concentración de suero artificial de 0,1 nM para fines gráficos. Esto no altera la CE_{50} aparente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y técnicas generales

A no ser que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que entienden habitualmente los expertos habituales en la materia. Además, a no ser que se requiera de otro modo por contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, la nomenclatura usada en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan habitualmente en este campo.

Los procedimientos y técnicas de la presente divulgación se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en este campo y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se realizan a lo largo de la presente memoria descriptiva a no ser que se indique de otro modo. Véase, por ejemplo, Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring

- Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc (2002); Harlow y Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); y Coligan y col., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se consigue habitualmente en este campo o como se describe en el presente documento. La nomenclatura usada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento son los bien conocidos y usados habitualmente en este campo.
- 5 Se entenderá que los siguientes términos, a no ser que se indique de otro modo, tienen los siguientes significados:
- Como se usa en el presente documento, el término “ALK-1” se refiere a una quinasa de tipo receptor de activina 1 de mamífero. Se pretende que el término ALK-1 incluya ALK-1 recombinante y formas quiméricas recombinantes de ALK-1 que pueden prepararse por procedimientos de expresión recombinante convencionales.
- Como se usa en el presente documento, el acrónimo “mAb” se refiere a un anticuerpo monoclonal.
- 15 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que se denomina por número es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se obtiene del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1.12.1 se obtiene del hibridoma 1.12.1.
- 1.12.1 se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que se aisló del hibridoma.
- 1.12.1 (rWT) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado.
- 20 1.12.1 (M29I/D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía dos mutaciones de aminoácidos específicas (metionina en la posición 29 en la cadena pesada reemplazada con isoleucina y ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera reemplazado con alanina).
- 1.12.1 (M29I) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una mutación de un único aminoácido específica en la que la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplazó con isoleucina.
- 25 1.12.1 (D19A) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expresado que contenía una mutación de un único aminoácido específica en la que el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena ligera se reemplazó con alanina.
- Como se usa en el presente documento, “crecimiento celular anómalo”, a menos que se indique de otro modo, se refiere a crecimiento celular que es independiente de los mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición de contacto).
- 30 Como se usa en el presente documento, el término “adyacente” se usa para hacer referencia a secuencias de nucleótidos que están unidas directamente entre sí, sin tener nucleótidos intermedios. Por ejemplo, el pentanucleótido 5'-AAAAA-3' es adyacente al trinucleótido 5'-TTT-3' cuando los dos están conectados de este modo: 5'-AAAAATTT-3' o 5'-TTTAAAAA-3', pero no cuando los dos están conectados de este modo: 5'-AAAACTTT-3'.
- 35 El término “agente” se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.
- Como se usa en el presente documento, “aliviar” una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Esto incluye, pero sin limitación, afectar al tamaño, crecimiento y/o masa de un tumor, el alcance o progresión de la metástasis, y similares, en un paciente en comparación con estos mismos parámetros en el paciente antes de o en ausencia del procedimiento de tratamiento.
- 40 Como se usa en el presente documento, el acrónimo “Id1” se refiere a un gen diana corriente abajo específico de ALK-1, el gen Id1, que es importante para la angiogénesis. Se ha indicado que el gen Id1 controla la ruta de angiogénesis en ciertos cánceres desconectando la producción de una proteína, trombospondina-1 (TSP-1), un supresor de angiogénesis de origen natural. Por ejemplo, se ha indicado que el gen Id1, que está muy expresado en melanoma, cáncer de mama, de cabeza y cuello, de cerebro, cervical, de próstata, pancreático y testicular, da como resultado expresión reducida de TSP-1 y formación de vasos sanguíneos tumorales aumentada. Volpert, Olga V. y col, “Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1”, Cancer Cell, Dic. 2002, Vol. 2, páginas 473-483.
- 45 Como se usa en el presente documento, el término “Smad” se refiere a proteínas de dominio Smad halladas en una serie de especies desde nematodos hasta seres humanos. Estas proteínas altamente conservadas contienen un dominio MH1 N-terminal que entra en contacto con el ADN, y está separado por una región de engarce corta del dominio MH2 C-terminal, mostrando este último una sorprendente similitud con dominios asociados a horquilla (FHA). Los dominios FHA y Smad (MH2) comparten una estructura común consistente en una intercalación de once
- 50

5 cadenas beta en dos láminas con topología de greca. Las proteínas Smad median en la señalización por las citocinas TGF-beta/activina/BMP-2/4 de Ser/Thr proteína quinasas receptoras en la superficie celular al núcleo. Las proteínas Smad se dividen en tres clases funcionales: las Smad reguladas por receptor (R-Smad), que incluyen Smad1, 2, 3, 5, 8, cada una de las cuales está implicada en una ruta de señalización específica de ligando; las Smad co-mediadoras (co-Smad), que incluyen Smad4, que interactúan con R-Smad para participar en la señalización; y las Smad inhibitoras (I-Smad), que incluyen Smad-6 y 7, que bloquean la activación de R-Smad y Co-Smad, regulando de forma negativa de este modo las rutas de señalización.

10 Como se usa en el presente documento, el término "TGF-beta" se refiere al factor de crecimiento transformante beta, que constituye una familia de citocinas multifuncionales (TGF-beta 1-5) que regulan el crecimiento y diferenciación celular. El factor de crecimiento transformante (TGF) es uno de muchos factores de crecimiento caracterizados que existen en la naturaleza. Desempeñan papeles cruciales en ratones "SCID" con inmunodeficiencia combinada grave. Muchas células sintetizan TGF-beta y esencialmente todas tienen receptores específicos para este péptido. TGF-beta regula las acciones de muchos otros factores de crecimiento peptídicos y determina una dirección positiva o negativa de sus efectos. TGF-beta es una citocina supresora de tumores con efectos inhibidores del crecimiento en células epiteliales. TGF-β también puede actuar como un promotor tumoral induciendo una transición epitelial a mesenquimal. TGF-β inactiva varias proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular y de este modo ejerce sus efectos inhibidores del crecimiento en células epiteliales provocando que se detengan en la fase G1 del ciclo celular. La proteína actúa como un homodímero ligado a disulfuro. Su secuencia se caracteriza por la presencia de varios restos de cisteína C-terminales, que forman enlaces disulfuro interconectados dispuestos en una topología de tipo nudo. Se ha observado una disposición de "nudo de cistina" similar en las estructuras de algunos inhibidores de enzimas y neurotoxinas que se unen a canales de Ca²⁺ abiertos por tensión, aunque la topología precisa difiere. Los genes TGF-beta se expresan diferencialmente, lo que sugiere que las diversas especies de TGF-beta pueden tener distintos papeles fisiológicos *in vivo*.

25 Como se usa en el presente documento, el término "TGF-beta 1" se refiere al receptor de factor de crecimiento transformante beta tipo 1, que es un péptido de 112 restos de aminoácidos derivado por escisión proteolítica del extremo C-terminal de una proteína precursora. El examen de los niveles de ARNm de TGF-beta 1 en tejidos murinos adultos indica que la expresión es predominante en bazo, pulmón y placenta. Se cree que TGF-beta 1 desempeña papeles importantes en los procesos patológicos.

30 Como se usa en el presente documento, el término "SCID" se refiere a ratones con inmunodeficiencia combinada grave.

Como se usa en el presente documento, el término "HUVEC" se refiere a células endoteliales de venas umbilicales humanas.

35 Como se usa en el presente documento, los "aminoácidos" están representados por el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras que corresponde a los mismos o por el código de una letra que corresponde a los mismos, como se indica en la siguiente tabla:

Nombre Completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido Glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	T
Alanina	Ala	La
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	Yo
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P

	(continuación)	
Nombre Completo	Código de tres letras	Código de una letra
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

5 Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology-A Synthesis* (2ª edición, E.S. Golub y DR Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (1991)),

10 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieran entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o el grado de similitud pueden ajustarse hacia arriba para corregir con respecto a la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste se conocen bien por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994).

15 Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, 20 lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

Como alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet y col, *Science* 258:1443-45 (1992). Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

25 En ciertos casos, las sustituciones de aminoácidos para un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo son las que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos, pero conservan aún unión específica con ALK-1. Los análogos pueden incluir diversas sustituciones para la secuencia peptídica que aparece normalmente. Por ejemplo, pueden realizarse 30 sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples, preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas, en la secuencia que aparece normalmente, por ejemplo, en la parte del polipéptido fuera del dominio o los dominios que forman contactos intermoleculares. También pueden realizarse sustituciones de aminoácidos en el dominio o los dominios que forman contactos intermoleculares que pueden mejorar la actividad del polipéptido. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia 35 parental; por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería alterar la lámina β anti-paralela que compone el dominio de unión de inmunoglobulina que aparece en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia parental. En general, no se usaría glicina y prolina en una lámina β anti-paralela. Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y 40 Thornton y col., *Nature* 354:105 (1991),

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo 45 sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína natural y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o 50 recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol.Biol.* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la divulgación con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente 55 blastp o tblastn, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

La longitud de las secuencias polipeptídicas comparadas con respecto a homología generalmente será de al menos

aproximadamente 16 restos de aminoácidos, habitualmente al menos aproximadamente 20 restos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 restos, normalmente al menos aproximadamente 28 restos y más preferentemente más de aproximadamente 35 restos. Cuando se busca una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias de aminoácidos. El término "análogo" como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que están comprendidos de un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos de origen natural deducida y que tiene al menos una de las propiedades del polipéptido de origen natural. Normalmente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución de aminoácidos conservativa (o adición o delección) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos normalmente son de al menos 20 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más largos, y con frecuencia pueden ser tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa

Se usan habitualmente análogos peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS página 392 (1985); y Evans y col. J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Dichos compuestos se desarrollan con frecuencia con la ayuda de modelos moleculares informáticos.

Pueden usarse miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son similares estructuralmente a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $\text{CH}_2\text{SO}-$, por procedimientos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un aminoácido D del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) pueden usarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica por procedimientos conocidos en la técnica (Rizo y Glerasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)), por ejemplo, añadiendo restos de cisteína internos capaces de formar enlaces disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Un "anticuerpo" o una "inmunoglobulina" (Ig) intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Solamente hay dos tipos de cadena ligera: λ y κ . En seres humanos son similares, pero solamente está presente un tipo en cada anticuerpo. Las cadenas pesadas se clasifican como μ , delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Véase en general, Fundamental Immunology C. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). En un caso preferido, el anticuerpo es un IgG y es un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En un caso más preferido, el anticuerpo anti-ALK-1 es subclase IgG2.

Cada cadena pesada está comprendida por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH_1 , CH_2 y CH_3 . Cada cadena ligera está comprendida por un dominio variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, C_L . Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco conservadas" (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino a extremo carboxilo en el siguiente orden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia y col, Nature 342:878-883 (1989).

Los dominios variables de cada par de cadena pesada/ligera (V_H y V_L) forman el sitio de unión de anticuerpo que interacciona con un antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo IgG intacto, por ejemplo, tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos huésped o factores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Los anticuerpos deben tener suficiente diversidad de unión a antígeno para reconocer cada posible patógeno (muchas regiones V) manteniendo a la vez la eficacia biológica de sus regiones C (pocas regiones C). Los genes Ig se cortan y empalman de forma aleatoria juntos a partir de segmentos génicos que permiten que se usen muchas regiones V con algunas regiones C. Los segmentos génicos que codifican cadenas Ig H, kappa y lambda se encuentran en tres cromosomas diferentes. Durante el desarrollo de linfocitos B, las enzimas recombinasa retiran intrones y algunos exones de los segmentos de ADN y corte y empalme en genes de Ig funcionales.

Los segmentos de genes de Ig en mamíferos se disponen en grupos de exones “variable” (V), de “diversidad” (D), de “unión” (J) y “constante” (C). Los segmentos de V kappa (V_{κ}) codifican cada uno las primeras dos CDR y tres FR de la región V de cadena kappa, más algunos restos de CDR3. Los segmentos J kappa (J_{κ}) codifican cada uno el resto de CDR3 y la cuarta FR. C kappa (C_{κ}) codifica la región C completa de la cadena ligera kappa. El ADN que codifica cadena kappa humana incluye aproximadamente 40 segmentos V kappa (V_{κ}) funcionales, cinco segmentos J kappa (J_{κ}), y un segmento de gen C kappa (C_{κ}), así como algunos segmentos génicos que contienen codones de parada (“pseudogenes”). El ADN de cadena lambda humana (A) contiene aproximadamente 30 segmentos V lambda funcionales (V_{λ}) y cuatro conjuntos funcionales de segmentos J lambda (J_{λ}) y C lambda (C_{λ}). Una J lambda (J_{λ}) particular siempre se empareja con su C lambda (C_{λ}) correspondiente, a diferencia de J kappa (J_{κ}) que se emparejan todos con la misma C kappa (C_{κ}). El ADN para cadena H humana incluye aproximadamente 50 segmentos V_H funcionales, 30 segmentos D_H y seis segmentos J_H . Las primeras dos CDR y tres FR del dominio variable de cadena pesada están codificadas por V_H . CDR3 está codificada por algunos nucleótidos V_H , todos de D_H , y parte de J_H , mientras que FR4 está codificada por el resto del segmento génico J_H . Hay varios segmentos génicos individuales en el ADN para cada dominio de cadena pesada y región de membrana de cada isotipo, dispuestos en el orden en el que se expresan por linfocitos B.

El término “polipéptido” abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos proteicos y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

La expresión “proteína aislada”, “polipéptido aislado” o “anticuerpo aislado” es una proteína, polipéptido o anticuerpo que según su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo, (2) está sin otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no aparece en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina de forma natural estará “aislado” de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede hacerse sustancialmente sin componentes asociados de forma natural por aislamiento, usando técnicas de purificación proteica bien conocidas en este campo.

Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo anti-ALK-1 que se ha purificado por afinidad usando ALK-1 y un anticuerpo anti-ALK-1 que se ha sintetizado por una línea celular *in vitro*.

Una proteína o polipéptido es “sustancialmente puro”, “sustancialmente homogéneo” o “sustancialmente purificado” cuando al menos aproximadamente del 60 al 75 % de una muestra presenta una única especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína sustancialmente puro puede comprender normalmente aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % p/p de una muestra proteica, más habitualmente aproximadamente el 95 % y preferentemente puede ser más del 99 % puro. La pureza u homogeneidad proteica puede indicarse por varios medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra proteica, seguido de visualización de una única banda polipeptídica tras la tinción del gel con una tinción bien conocida en la técnica. Para ciertos fines, puede proporcionarse mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica de purificación.

La expresión “fragmento polipeptídico” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxilo terminal pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural. En algunos casos, los fragmentos son de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud. En otros casos, los fragmentos son de al menos 14, al menos 20, al menos 50 o al menos 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud.

El término “análogo” o “análogo polipeptídico” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende un segmento que tiene identidad sustancial con alguna secuencia de aminoácidos de referencia y tiene sustancialmente la misma función o actividad que la secuencia de aminoácidos de referencia. Normalmente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución de aminoácidos conservativa (o inserción o delección) con respecto a la secuencia de referencia. Los análogos pueden ser de al menos 20 o 25 aminoácidos de longitud o pueden ser de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud o más largos, y con frecuencia pueden ser tan largos como el polipéptido de longitud completa. Algunos casos de la divulgación incluyen fragmentos polipeptídicos o anticuerpos de análogos polipeptídicos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 sustituciones de la secuencia de aminoácidos de línea germinal. Los expertos habituales en la materia pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina siguiendo las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

La expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de anticuerpo”), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, ALK-1 o ECD de ALK-1). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y $C_H 1$; (ii) un $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y $C_H 1$; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de una única rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en

un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento F_v , V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, por un engarce sintético que permite que se compongan como una cadena proteica individual en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como F_v de cadena sencilla (scFv)); véase, por ejemplo, Bird y col. *Science* 242:423-426 (1988) y Huston y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:5879-5883 (1988)). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos también están abarcadas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que se expresan dominios V_H y V_L en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:6444-6448 (1993); Poljak y col. *Structure* 2:1121-1123 (1994)).

Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión mayores, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con otros uno o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen uso de la región central de estreptavidina para realizar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov y col. *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) y uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para realizar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov y col. *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen cuando se incorporan una o más CDR de un anticuerpo en una molécula de forma covalente o no covalente para hacerla una inmunoadhesina que se une específicamente a un antígeno de interés, tal como ALK-1 o ECD de ALK-1. En dichos casos, la CDR o las CDR pueden incorporarse como parte de una cadena polipeptídica mayor, pueden unirse covalentemente a otra cadena polipeptídica o pueden incorporarse de forma no covalente.

Pueden prepararse partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y $F(ab')_2$, a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describen en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. La expresión abarca anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que se han cambiado, por ejemplo, para reducir la posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar cisteínas que podrían provocar plegamiento indeseable, etc. La expresión también abarca dichos anticuerpos producidos de forma recombinante en células no humanas, que podrían transmitir glicosilación no típica de células humanas. Estos anticuerpos pueden prepararse de una diversidad de maneras, como se describe más adelante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo neutralizador", "un anticuerpo inhibidor" o anticuerpo antagonista significa un anticuerpo que inhibe la ruta de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. En un caso preferido, el anticuerpo inhibe la ruta de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 en al menos aproximadamente el 20 %, preferentemente el 40 %, más preferentemente el 60 %, aún más preferentemente el 80 % o aún más preferentemente el 85 %. El potencial neutralizador o inhibidor de anticuerpos anti-ALK-1 humanos puede determinarse, por ejemplo, por su capacidad para inhibir la regulación positiva de un gen diana cadena abajo específico de ALK-1, Id1, como se presenta en el Ejemplo 12, para inhibir la fosforilación Smad1 determinada por transferencia de Western usando sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences como se presenta en el Ejemplo 13.

La expresión "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. Por ejemplo, una o más de las CDR de un anticuerpo quimérico pueden derivar de un anticuerpo anti-ALK-1 humano. En otro ejemplo, todas las CDR pueden derivar de anticuerpos anti-ALK-1 humanos. En otro ejemplo, las CDR de más de un anticuerpo anti-ALK-1 humano pueden combinarse en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-ALK-1 humano, una CDR2 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-ALK-1 humano y una CDR3 de la cadena ligera de un tercer anticuerpo anti-ALK-1 humano, y las CDR de la cadena pesada pueden derivar de uno o más anticuerpos anti-ALK-1 adicionales. Además, las regiones marco conservadas pueden derivar de uno de los anticuerpos anti-ALK-1 de los que se han tomado una o más de las CDR o de uno o más anticuerpos humanos diferentes. Además, como se ha analizado anteriormente en el presente documento, el anticuerpo quimérico incluye un anticuerpo que comprende una parte derivada de las secuencias de línea germinal de más de una especie.

En algunos casos, un anticuerpo quimérico de la divulgación es un anticuerpo anti-ALK-1 humanizado. Un anticuerpo anti-ALK-1 humanizado de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos de una o más regiones marco conservadas y/o la secuencia de aminoácidos de al menos una parte de la región constante de uno o más anticuerpos anti-ALK-1 humanos de la divulgación y comprende además secuencias derivadas de un anticuerpo anti-ALK-1 no humano, por ejemplo secuencias CDR.

Como se usa en el presente documento, el término "ELISA" se refiere a un ensayo inmunoabsorbente ligado a

enzimas. Este ensayo se conoce bien por los expertos en la materia. Pueden encontrarse ejemplos de este ensayo en Vaughan, T.J. y col., *Nature Biotech.* 14:309-314 (1996), así como en el Ejemplo 2 de la presente solicitud.

La expresión “resonancia de plasmón superficial”, como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que posibilita el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIACORE (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jonsson y col., *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson y col. *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson y col., *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); y Jonsson y col., *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

El término “afinidad” se refiere a una medida de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. La atracción intrínseca del anticuerpo por el antígeno se expresa normalmente como la constante en equilibrio de afinidad de unión (K_D) de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la K_D es ≤ 1 mM, preferentemente ≤ 100 nM. Una constante de afinidad de unión K_D puede medirse por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ como se analiza en los Ejemplos 7 y 8.

El término “ k_{off} ” se refiere a la constante de tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Una constante de tasa de disociación k_{off} puede medirse por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el sistema BIACORE como se analiza en los Ejemplos 7 y 8.

El término “avidez” se refiere a la fuerza combinatoria funcional de un anticuerpo con su antígeno que se basa tanto en la afinidad como en las valencias del anticuerpo. Como se usa en el presente documento, este término describe la afinidad aumentada que se produce como resultado de múltiples sitios de unión a antígeno en una inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, la expresión “selectividad molecular” se refiere a la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno específico que es mayor que por otros antígenos. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser selectivos para ALK-1 sobre ALK-2 a ALK-7, lo que significa que la afinidad de unión del anticuerpo por ALK-1 es al menos 2 veces mayor, por ejemplo 4 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces o más, que por ALK-2 a ALK-7. Dichas afinidades de unión pueden medirse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico capaz de unión específica con una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T o interactuar de otro modo con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupamiento de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser “lineal” o “conformacional”. En un epítipo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula de interacción (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción aparecen a lo largo de restos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí. Una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítipo, por ejemplo, usando las técnicas descritas en la presente divulgación. Como alternativa, durante el procedimiento de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos pueden dilucidar información acerca de epítipos deseables. A partir de esta información, es posible después explorar de forma competitiva anticuerpos con respecto a unión con el mismo epítipo. Un enfoque para conseguir esto es realizar estudios de competición cruzada para encontrar anticuerpos que se unan competitivamente entre sí, es decir, los anticuerpos compiten por unión con el antígeno. Se describe un procedimiento de alto rendimiento para “clasificar” anticuerpos basándose en su competición cruzada en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 03/48731.

Como se usa en el presente documento, el término “clasificar” se refiere a un procedimiento para agrupar anticuerpos basándose en sus características de unión a antígenos. La asignación de grupos es en cierta medida arbitraria, dependiendo de lo diferentes que sean los patrones de unión observados para todos los anticuerpos ensayados. Por lo tanto, los grupos no siempre se correlacionan con epítipos determinados por otros medios y no deberían usarse para definir epítipos.

El término “competir”, como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, compite por la unión con el antígeno con un segundo anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, cuando la unión del primer anticuerpo con su epítipo afín se reduce de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo con su epítipo también se reduce de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede suceder, pero no es necesario. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo con su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo con su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando afín, bien en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos “compiten de forma cruzada” entre sí por la unión con su epítipo o sus epítipos respectivos. Los anticuerpos tanto competidores como competidores de forma cruzada están abarcados

por la presente divulgación. Independientemente del mecanismo por el que se produzca dicha competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión con un epítipo común, o parte del mismo, y similares), el experto en la materia apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que en dichos anticuerpos competidores y/o competidores cruzados están abarcados y pueden ser útiles para los procedimientos desvelados en el presente documento.

El término “polinucleótido” como se indica en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o una forma modificada de uno de los tipos de nucleótidos. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias.

La expresión “polinucleótido aislado” como se usa en el presente documento significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos, que según su origen, el “polinucleótido aislado” (1) no está asociado con todos o una parte de los polinucleótidos con los que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está unido operativamente con un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

La expresión “nucleótidos de origen natural” como se usa en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión “nucleótidos modificados” como se usa en el presente documento incluye nucleótidos con grupos de azúcares modificados o sustituidos y similares. La expresión “enlaces oligonucleotídicos” indicada en el presente documento incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche y col., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec y col., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein y col., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon y col, Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon y col, Oligonucleotides and Analogues: A practical Approach, páginas 87-108 (F. Eckstein, Ed, Oxford University Press, Oxford England (1991)); patente de Estados Unidos Nº 5.151.510; Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección, si se desea.

Las secuencias “unidas operativamente” incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

La expresión “secuencia de control de la expresión” como se usa en el presente documento significa secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencias consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad proteica, y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción proteica. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión ribosómico y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. La expresión “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

El término “vector”, como se usa en el presente documento, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunos casos, el vector es un plásmido, es decir, un trozo bicatenario circular de ADN en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. En algunos casos, el vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. En algunos casos, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episómicos). En otras realizaciones, los vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”).

La expresión “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), como se usa en el presente documento, significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que “célula huésped recombinante” y “célula huésped” significan no solamente la célula objeto particular sino también toda la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún está incluida dentro del alcance de la expresión “célula huésped” como se usa en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión “línea germinal” se refiere a las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de los genes de anticuerpo y segmentos génicos a medida que pasan de los parentales

a la descendencia mediante las células germinales. Esta secuencia de línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en linfocitos B maduros que se han alterado por acontecimientos de recombinación e hipermutación durante el transcurso de la maduración de linfocitos B. Un anticuerpo que “usa” una línea germinal particular tiene una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que se alinea más estrechamente con la secuencia de nucleótidos de línea germinal o con la secuencia de aminoácidos que especifica. Dichos anticuerpos se mutan frecuentemente en comparación con la secuencia de línea germinal.

La expresión “porcentaje de identidad de secuencia” en el contexto de secuencias de ácido nucleico significa los restos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. La longitud de comparación de identidad de secuencia puede ser a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferentemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Hay varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, pueden compararse las secuencias polinucleotídicas usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en la versión de paquete de Wisconsin 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998)). A no ser que se especifique de otro modo, se usan los parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG Versión 6.1,

Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a no ser que se especifique de otro modo. Por lo tanto, debería entenderse que una referencia a un ácido nucleico que tenga una secuencia particular abarca su cadena complementaria, con su secuencia complementaria.

La expresión “similitud sustancial” o “similitud de secuencia sustancial”, cuando se hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, significa que cuando se alinea de forma óptima con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 85 %, preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, como se mide por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se ha analizado anteriormente.

La expresión “porcentaje de identidad de secuencia” en el contexto de secuencias de aminoácidos significa que los restos en dos secuencias son iguales cuando se alinean para correspondencia máxima. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente cinco aminoácidos, habitualmente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más habitualmente al menos aproximadamente 30 aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos, más normalmente al menos aproximadamente 100 aminoácidos y aún más normalmente aproximadamente 150, 200 o más aminoácidos. Hay varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, pueden compararse secuencias de aminoácidos usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en el paquete de Wisconsin Versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.

Como se aplica a los polipéptidos, la expresión “identidad sustancial” o “similitud sustancial” significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto como se proporciona con los programas, comparten al menos el 70 %, 75 % u 80 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 % o 95 % de identidad de secuencia, y más preferentemente al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. En ciertos casos, las posiciones de restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas.

La expresión “secuencia señal”, también llamada péptido señal, péptido líder, se refiere a un segmento de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos en el extremo N-terminal de una proteína que permite que se secrete la proteína (que pase a través de una membrana celular). La secuencia señal se retira a medida que se secreta la proteína.

Como se usa en el presente documento, los términos “etiqueta” o “marcado” se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En un caso, la etiqueta es un marcador detectable, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión con un polipéptido de restos de biotínulo que puede detectarse por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por procedimientos ópticos o colorimétricos). En otro caso, la etiqueta o marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un conjugado farmacológico o toxina. Se conocen en la técnica y pueden usarse diversos procedimientos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I ,

¹³¹I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos de biotín, epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores epitópicos), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracín diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunos casos, los marcadores se unen por ramas espaciadoras de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

El término "primate" se refiere a un mamífero del orden primates, que incluye los antropoides y prosimios, caracterizado por desarrollo refinado de las manos y los pies, un hocico acortado y un gran cerebro. El orden mamífero de los primates incluye seres humanos, simios, monos y prosimios, o primates inferiores.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas del trastorno que se trate. En referencia al tratamiento de cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad que tiene al menos uno de los siguientes efectos: reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado, preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir en algún grado (es decir, ralentizar en algún grado, preferentemente detener) el crecimiento tumoral, y aliviar en algún grado (o, preferentemente, eliminar) uno o más síntomas asociados con el cáncer.

"Tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un procedimiento para aliviar o anular un trastorno biológico y/o sus síntomas acompañantes. Con respecto al cáncer, estos términos significan simplemente que la esperanza de vida de un individuo afectado por un cáncer aumentará o que se reducirá uno o más de los síntomas de la enfermedad.

"Poner en contacto" se refiere a poner un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la presente divulgación y una ALK-1 diana, o epítomo de la misma, juntos de tal modo que el anticuerpo pueda afectar a la actividad biológica de la ALK-1. Dicho "contacto" puede conseguirse *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, una placa de petri o similares. En un tubo de ensayo, la puesta en contacto puede implicar solamente un anticuerpo o partes de unión a antígeno del mismo y ALK-1 o epítomo de la misma o puede implicar células completas. Las células también pueden mantenerse o cultivarse en placas de cultivo celular y ponerse en contacto con anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos en ese ambiente. En este contexto, la capacidad de un anticuerpo particular o partes de unión a antígeno del mismo para afectar a un trastorno relacionado con ALK-1, es decir, la CI_{50} de anticuerpo, puede determinarse antes de que se intente el uso del anticuerpo *in vivo* con organismos vivos más complejos. Para células fuera del organismo, existen múltiples procedimientos, y se conocen bien por los expertos en la materia, para poner en contacto ALK-1 con los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos.

El acrónimo "FACS" se refiere a Separación de Células Activadas por Fluorescencia. El acrónimo FACS y citometría de flujo se usan de forma intercambiable. El marcaje fluorescente permite la investigación de estructura y función celular. La inmunofluorescencia, la aplicación más ampliamente usada, implica la tinción de células con anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes tales como fluoresceína y ficoeritrina. Este procedimiento se usa con frecuencia para marcar moléculas en la superficie celular, pero los anticuerpos pueden dirigirse a dianas en el citoplasma. En inmunofluorescencia directa un anticuerpo para una molécula se conjuga directamente con un colorante fluorescente, y las células se tiñen en una etapa. En la inmunofluorescencia indirecta, el anticuerpo primario no se marca, y se añade un segundo anticuerpo fluorescente conjugado que es específico para el primer anticuerpo.

Anticuerpos anti-ALK-1

La presente divulgación concierne a anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 neutralizantes aislados o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen a ALK-1 de primate, preferentemente el ECD de ALK-1 de primate, más preferentemente el ECD de ALK-1 humana. En un caso preferido, la divulgación concierne a anticuerpos neutralizadores aislados que son anticuerpos monoclonales completamente humanos o partes de unión a antígeno de los mismos. Preferentemente, los anticuerpos humanos son anticuerpos anti-ALK-1 humanos recombinantes que tiene mayor afinidad por ALK-1 que por ALK-2 a ALK-7. En algunos casos, se producen anticuerpos anti-ALK-1 humanos inmunizando un animal transgénico no humano, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana de modo que el animal transgénico produce anticuerpos humanos. Diversos aspectos de la divulgación se refieren a dichos anticuerpos y pares de unión a antígeno y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y célula huésped para realizar dichos anticuerpos y partes de unión a antígeno. También están abarcados por la divulgación procedimientos para usar los anticuerpos y partes de unión a antígeno de la presente divulgación para anular la ruta de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 o para detectar ALK-1 *in vitro* o *in vivo*.

Un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación puede comprender una cadena ligera kappa humana o una lambda humana o una secuencia de aminoácidos derivada de la misma. Comprendiendo en algunos casos una cadena ligera kappa, el dominio variable de cadena ligera (V_L) usa un gen V_K A27, A2, A1, A3, B3, B2, L1 o L2 humano. En

algunos casos, la cadena ligera usa un gen V_K L1 humano y un gen J_K 4 humano; un gen V_K A27 humano y un gen J_K 5 humano o un gen J_K 4 humano; un gen V_K B3 humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K L2 humano y un gen J_K 3 humano; un gen V_K A2 humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K A3 humano y un gen J_K 4 humano; un gen V_K A1 humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K B2 humano y un gen J_K 4 humano; o un gen V_K A2 humano y un gen J_K 1 humano.

En algunos casos, la V_L del anticuerpo anti-ALK-1 comprende una o más sustituciones, deleciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de V_K de línea germinal. En algunos casos, la V_L del anticuerpo anti-ALK-1 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de V_K de línea germinal. En algunos casos, una o más de las sustituciones de línea germinal es en las regiones CDR de la cadena ligera. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos de V_K en relación con la línea germinal son en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones relativas a línea germinal halladas en una cualquiera o más de las V_L de los anticuerpos proporcionados en el presente documento como se muestra, por ejemplo, en la Figura 7. En algunos casos, los cambios de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones, pero implican una sustitución diferente que en el anticuerpo de referencia.

En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos en relación con la línea germinal se producen en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones de línea germinal en cualquiera de las V_L de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1, pero las sustituciones pueden representar sustituciones de aminoácidos conservativas en dicha posición o dichas posiciones en relación con el aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si una posición particular en uno de estos anticuerpos se cambia en relación con la línea germinal y es glutamato, se puede sustituir aspartato en esa posición. De forma similar, si una sustitución de aminoácidos comparada con la línea germinal en un anticuerpo ejemplificado es serina, se puede sustituir de forma conservativa con treonina la serina en esa posición. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se han analizado anteriormente.

En algunos casos, el anticuerpo anti-ALK-1 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 4. En otros casos, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1.

En algunos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-ALK-1 humano comprende la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo 1.12.1 (SEQ ID NO: 8); 1.11.1 (SEQ ID NO: 12); 1.13.1 (SEQ ID NO: 16); 1.14.1 (SEQ ID NO: 20); 1.151.1 (SEQ ID NO: 24); 1.162.1 (SEQ ID NO: 28); 1.183.1 (SEQ ID NO: 32); 1.8.1 (SEQ ID NO: 36); 1.9.1 (SEQ ID NO: 40); 4.10.1 (SEQ ID NO: 44); 4.24.1 (SEQ ID NO: 48); 4.38.1 (SEQ ID NO: 52); 4.58.1 (SEQ ID NO: 56); 4.62.1 (SEQ ID NO: 60); 4.68.1 (SEQ ID NO: 64); 4.72.1 (SEQ ID NO: 68); 5.13.1 (SEQ ID NO: 72); 5.34.1 (SEQ ID NO: 76); 5.53.1 (SEQ ID NO: 80); 5.56.1 (SEQ ID NO: 84); 5.57.1 (SEQ ID NO: 88); o 5.59.1 (SEQ ID NO: 92); o dicha secuencia de aminoácidos que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas. En otros casos la cadena ligera del anticuerpo anti-ALK-1 humano comprende la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo 1.27.1; 1.29.1 o 1.31.1. En algunos casos, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del comienzo de la CDR1 al final de la CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En algunos casos, la cadena ligera puede comprender las secuencias de aminoácidos de regiones CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas independientemente de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, respectivamente, de dos o más anticuerpos monoclonales seleccionados de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o teniendo cada una de dichas regiones CDR menos de 3 o menos de 2 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas.

En ciertos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-ALK-1 comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o dichas regiones CDR que tienen cada una menos de 3 o menos de 2 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas.

Con respecto a la cadena pesada, en algunos casos, el dominio variable (V_H) usa un gen V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59 humano. En algunos casos, la secuencia V_H del anticuerpo anti-ALK-1 contiene una o más sustituciones, deleciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos, de forma colectiva "mutaciones", en relación con la secuencia de aminoácidos de V_H de línea germinal. En algunos casos, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de V_H de la línea germinal. En algunos casos, la mutación o las mutaciones son sustituciones no conservativas en comparación

con la secuencia de aminoácidos de línea germinal. En algunos casos, las mutaciones están en las regiones CDR de la cadena pesada. En algunos casos, la cadena pesada usa un gen V_H 3-33 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 3B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-61 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 3-3 humano y un gen J_H 38 humano; un gen V_H 4-31 humano y un gen J_H 3B humano; un gen V_H 4-59 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D 3-22 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 3-15 humano, un gen D 3-22 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 5-12 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 4-23 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D 2-2 humano y un gen J_H 5B humano; un gen V_H 4-31 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 3-15 humano, un gen D 1-1 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D 6-19 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D 3-10 humano y un gen J_H 6B humano; o un gen V_H 3-11 humano, un gen D 6-6 humano y un gen J_H 6B humano.

En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos son en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones de línea germinal en una cualquiera o más de las V_H de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En otros casos, los cambios de aminoácidos son en una o más de las mismas posiciones pero implican una sustitución diferente que en el anticuerpo de referencia.

En algunos casos, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otros casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo 1.12.1 (SEQ ID NO: 6); 1.11.1 (SEQ ID NO: 10); 1.13.1 (SEQ ID NO: 14); 1.14.1 (SEQ ID NO: 18); 1.151.1 (SEQ ID NO: 22); 1.162.1 (SEQ ID NO: 26); 1.183.1 (SEQ ID NO: 30); 1.8.1 (SEQ ID NO: 34); 1.9.1 (SEQ ID NO: 38); 4.10.1 (SEQ ID NO: 42); 4.24.1 (SEQ ID NO: 46); 4.38.1 (SEQ ID NO: 50); 4.58.1 (SEQ ID NO: 54); 4.62.1 (SEQ ID NO: 58); 4.68.1 (SEQ ID NO: 62); 4.72.1 (SEQ ID NO: 66); 5.13.1 (SEQ ID NO: 70); 5.34.1 (SEQ ID NO: 74); 5.53.1 (SEQ ID NO: 78); 5.56.1 (SEQ ID NO: 82); 5.57.1 (SEQ ID NO: 86); o 5.59.1 (SEQ ID NO: 90); o dicha secuencia de aminoácidos de V_H que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 u 11 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas. En otros casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos V_H del anticuerpo 1.27.1; 1.29.1 o 1.31.1. En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del comienzo de la CDR1 al final de la CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En algunos casos, la cadena pesada comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o dichas regiones que tienen cada una menos de 8, menos de 6, menos de 4 o menos de 3 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas.

En algunos casos, las regiones CDR de cadena pesada se seleccionan independientemente de las regiones CDR de dos o más anticuerpos seleccionados de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En otros casos, el anticuerpo comprende una cadena ligera como se ha desvelado anteriormente y una cadena pesada como se ha desvelado anteriormente. En un caso adicional, las CDR de cadena ligera y las CDR de cadena pesada son del mismo anticuerpo.

En diversos casos, los anticuerpos anti-ALK-1 tienen la secuencia o las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa y cadena ligera de longitud completa, las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera o la secuencia de aminoácidos de cadena pesada desde el comienzo de la CDR1 al final de la CDR3 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera desde el comienzo de la CDR1 al final de la CDR3 de un anticuerpo anti-ALK-1 proporcionado en el presente documento.

Un tipo de sustitución de aminoácidos que puede realizarse es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que puede ser químicamente reactivo, a otro resto, tal como, sin limitación, alanina o serina. En un caso, hay una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede realizarse en una CDR o región marco conservada de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunos casos, la cisteína es canónica.

Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede realizarse es retirar sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Dichos sitios pueden aparecer en una CDR o región flanqueante de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de restos de cisteína y retirada de sitios proteolíticos puede reducir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y aumentar de este modo su homogeneidad. Otro tipo de

sustitución de aminoácidos es eliminar pares de asparagina-glicina, que forma sitios de desamidación potencial, alterando uno o ambos de los restos.

En algunos casos, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación se escinde. En diversos casos de la divulgación, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-ALK-1 pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

5

En un aspecto, la divulgación proporciona veinticinco anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 humanos inhibidores y las líneas celulares de hibridoma que los producen. En ciertos casos, los anticuerpos de la presente divulgación son IgG designados como: 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1. En casos preferidos, el anticuerpo anti-ALK-1 humano es anticuerpo 1.12.1, 1.12.1(M29I/D19A), 1.12.1(M29I), 1.12.1(D19A), 1.27.1, 1.14.1, 1.162.1, 1.31.1, 4.62.1 o 4.72.1.

10

Los anticuerpos reconocen epítomos expuestos en superficie en antígenos como regiones de secuencia lineal (primaria) o secuencia estructural (secundaria). Se usó BIAcore para definir el paisaje epitópico funcional y determinar la exclusividad epitópica de los anticuerpos anti-ALK-1 ejemplificados por la presente divulgación.

15

La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NO) de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa de las variantes de anticuerpo 1.12.1 y partes que contienen dominio variable de anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación, y las secuencias de aminoácidos deducidas correspondientes.

Tabla 1

Identificadores de secuencia (SEQ ID NO)								
Anticuerpo	Longitud completa				Parte que contiene dominio V			
	Pesada		Ligera		Pesada		Ligera	
	ADN	proteína	ADN	proteína	ADN	proteína	ADN	proteína
1.11.1					9	10	11	12
1.12.1(M29I/D19A)	1	2	3	4	5	6	7	8
1.12.1	95	100	101	102	103	104	126	127
1.12.1(rWT)	128	100	101	102	129	104	126	127
1.13.1					13	14	15	16
1.14.1					17	18	19	20
1.151.1					21	22	23	24
1.162.1					25	26	27	28
1.183.1					29	30	31	32
1.8.1					33	34	35	36
1.9.1					37	38	39	40
4.10.1					41	42	43	44
4.24.1					45	46	47	48
4.38.1					49	50	51	52
4.58.1					53	54	55	56
4.62.1					57	58	59	60
4.68.1					61	62	63	64
4.72.1					65	66	67	68
5.13.1					69	70	71	72
5.34.1					73	74	75	76
5.53.1					77	78	79	80

(continuación)

Identificadores de secuencia (SEQ ID NO)								
Anticuerpo	Longitud completa				Parte que contiene dominio V			
	Pesada		Ligera		Pesada		Ligera	
	ADN	proteína	ADN	proteína	ADN	proteína	ADN	proteína
5.56.1					81	82	83	84
5.57.1					85	86	87	88
5.59.1					89	90	91	92

1.12.1(M29/D19A) se refiere al anticuerpo anti-ALK-1 que contiene una única mutación de aminoácido específica en la cadena pesada en la que la metionina en la posición 29 se reemplaza con isoleucina y una única mutación de aminoácido específica en la cadena ligera en la que el ácido aspártico en la posición 19 se reemplaza con alanina como se describe en el Ejemplo 4.

1.12.1 se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que se aisló del hibridoma.

1.12.1 (rWT) se refiere a la variante de mAb 1.12.1 que se expresó como un mAb recombinante descrito en el Ejemplo 3.

La divulgación proporciona además variantes de cadena pesada y/o ligera de algunos de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos anteriormente enumerados, que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos. Para designar las variantes, la primera letra es el símbolo de una letra del aminoácido de la cadena de anticuerpo de origen natural, el número se refiere a la posición del aminoácido (en la que la posición 1 es el aminoácido N-terminal de la FR1), y la segunda letra es el símbolo de una letra del aminoácido variante.

En más casos adicionales, la divulgación incluye anticuerpos que comprenden secuencias de aminoácidos de dominio variable con más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 % o más del 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos anteriormente enumerados.

Clase y subclase de anticuerpos anti-ALK-1

La clase y subclase de anticuerpos anti-ALK-1 puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles en el mercado. La clase y subclase puede determinarse por ELISA, transferencia de Western así como otras técnicas. Como alternativa, la clase y subclase puede determinarse secuenciando todos o una parte de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

La clase de un anticuerpo anti-ALK-1 obtenido como se ha descrito anteriormente puede sustituirse con otra. En un aspecto de la divulgación, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla usando procedimientos bien conocidos en la técnica de modo que no incluya secuencias de ácido nucleico que codifiquen C_L o C_H "Antibody Engineering" (Kontermann & Dubel, Eds., Springer-Verlag, Berlín (2001)). Las moléculas de ácido nucleico que codifican V_L o V_H se unen después operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una C_L o C_H , respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto puede conseguirse usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprenda una cadena C_L o C_H , como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1 que era originalmente IgM puede cambiarse de clase a un IgG. Además, el cambio de clase puede usarse para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Un procedimiento preferido para producir un anticuerpo de la divulgación que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-ALK-1 y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-ALK-1, obtener el dominio variable de la cadena pesada, ligar el dominio variable de la cadena pesada con el dominio constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresar la cadena ligera y la cadena pesada ligada en una célula, y recoger el anticuerpo anti-ALK-1 con el isotipo deseado.

En algunos casos, el anticuerpo anti-ALK-1 es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-ALK-1 puede ser una molécula IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una IgD. En un caso preferido, el anticuerpo anti-ALK-1 es una IgG y es una subclase IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otro caso preferido, el anticuerpo es subclase IgG2.

Identificación de epítomos de ALK-1 reconocidos por anticuerpos anti-ALK-1

La divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal anti-ALK-1 humano que se une a ALK-1 y compite o compite de forma cruzada con y/o se une al mismo epítopo que: (a) un anticuerpo seleccionado de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1; (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_H en una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90 o 104, (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_L en una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92 o 127, (d) un anticuerpo que comprende tanto un número variable de cadena pesada como se define en (b) como un dominio variable de cadena ligera como se define en (c).

Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítopo o compite de forma cruzada por la unión con un anticuerpo anti-ALK-1 usando procedimientos conocidos en la técnica. En un caso, se permite que el anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación se una a ALK-1 en condiciones de saturación y después se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse a ALK-1. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse a ALK al mismo tiempo que el anticuerpo anti-ALK-1 de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo se une a un epítopo diferente que el anticuerpo anti-ALK-1 de referencia. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse a ALK-1 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítopo, un epítopo solapante, o un epítopo que está en proximidad cercana al epítopo unido por el anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación. Este experimento puede realizarse usando ELISA, RIA, BIACORE™, o citometría de flujo. Para ensayar si un anticuerpo anti-ALK-1 compite de forma cruzada con otro anticuerpo anti-ALK-1, se puede usar el procedimiento de competición descrito anteriormente en dos direcciones, es decir determinando si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de ensayo y viceversa. En un caso preferido, el experimento se realiza usando BIACORE™.

Afinidad de unión de anticuerpos anti-ALK-1 con ALK-1

La afinidad de unión (K_D) y velocidad de disociación (k_{off}) de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo con ALK-1 puede determinarse por procedimientos conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede medirse por ELISA, RIA, citometría de flujo o resonancia plasmón superficial, tal como BIACORE™. La velocidad de disociación puede medirse por resonancia de plasmón superficial. Preferentemente, la afinidad de unión y velocidad de disociación se mide por resonancia de plasmón superficial. Más preferentemente, la afinidad de unión y velocidad de disociación se miden usando BIACORE™. Se puede determinar si un anticuerpo tiene sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo anti-ALK-1 usando procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos para determinar K_D y k_{off} pueden usarse durante el estadio de exploración inicial, así como durante estadios de optimización posteriores.

Inhibición de la actividad de ALK-1 por anticuerpo anti-ALK-1

Pueden identificarse anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 que inhiben la unión de ALK-1 usando varios ensayos. Por ejemplo, pueden identificarse anticuerpos anti-ALK-1 neutralizadores por su inhibición de la regulación positiva de un gen diana cadena abajo específico de ALK-1, Id1, como se describe en el Ejemplo 12. Los anticuerpos anti-ALK-1 preferidos tienen una CI_{50} de no más de 500 nM, 300 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM o 1 nM.

También se puede determinar la capacidad de un anticuerpo anti-ALK-1 para inhibir la fosforilación de Smad1 determinada por Transferencia de Western usando Sistema de Captura de Imágenes Infrarrojas Odyssey como se describe en el Ejemplo 13. En diversos casos, el anticuerpo anti-ALK-1 tiene una CI_{50} en este ensayo de no más de 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM o 1 nM.

Inhibición de angiogénesis por anticuerpo anti-ALK-1

En otro caso, el anticuerpos anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe la angiogénesis de vasos humanos como se demuestra en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que se implantan de forma intradérmica células tumorales M24met de melanoma humano como se determina por análisis de IHC de ensayo de señal CD-31 humana por un factor de al menos 40 % en comparación con una muestra de control como se describe en el Ejemplo 17 y se muestra en la Tabla 13.

En otros casos, el anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo inhibe la angiogénesis de vasos humanos como se demuestra en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que se implanta de forma intradérmica colágeno como se determina por análisis de IHC de ensayo de señal CD-31 humana por un factor de al menos 50 % en comparación con una muestra de control como se describe en el Ejemplo 16 y se muestra en la Tabla 12.

Selectividad molecular y de especie

En otro aspecto de la divulgación los anticuerpos anti-ALK-1 demuestran selectividad tanto de especie como

molecular. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, se puede determinar la selectividad de especie o molecular para el anticuerpo anti-ALK-1 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad de especie usando transferencia de Western, resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore, ELISA, inmunoprecipitación o RIA.

5 En algunos casos, el anticuerpo anti-ALK-1 se une a ALK-1 de primate con una K_D que es al menos dos veces menor que su K_D para ALK-1 de roedor. En caso adicional, la K_D para ALK-1 de primate es al menos 3 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 500 veces o al menos 1.000 veces menor que su K_D para ALK-1 de roedor como se mide por citometría de flujo.

10 En otros casos, el anticuerpo anti-ALK-1 tiene una selectividad por ALK-1 sobre ALK-2 a ALK-7. En algunos casos, el anticuerpo anti-ALK-1 no muestra ninguna unión específica apreciable con ninguna otra proteína distinta de ALK-1. Preferentemente, el anticuerpo anti-ALK-1 se une al ECD de ALK-1 humana.

Procedimientos para producir anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

Inmunógeno ALK-1

15 En algunos casos, el inmunógeno o antígeno ALK-1 es ALK-1 aislada y/o purificada. En algunos casos, el inmunógeno ALK-1 es ALK-1 humana. En casos preferidos, el inmunógeno ALK-1 es el ECD de ALK-1 humana. ALK-1 humana o partes antigénicas de la misma, pueden prepararse de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, o puede obtenerse de distribuidores comerciales. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de ALK-1 humana se conocen (véase por ejemplo N° de Referencia de registro Genbank L17075). Está disponible en el mercado un gen ACVRL1 que codifica una ALK-1 de longitud completa de Invitrogen Inc., Clon ID
20 IOH21048. Por ejemplo, R&D Systems, Inc. vende la quimera ALK-1/Fc humana recombinante (Numero de Catálogo 370-AL) preparada por expresión de una secuencia de ADN que codifica los restos de aminoácidos de ECD 1-118 de ALK-1, fusionándose dicha secuencia de ADN con una secuencia de ADN que codifica las regiones de Fc de IgG humana mediante una secuencia de ADN que codifica un engarce polipeptídico en una línea celular de mieloma de
25 ratón. La quimera ALK-1/Fc humana Madura recombinante es una proteína monomérica ligada por disulfuro que tiene Asp 22 en el extremo amino terminal. Además, el Ejemplo 1 describe la preparación de proteína ECD de ALK-1 marcada con His que se ha usado para generación de hibridomas que producen un anticuerpo anti-ALK-1 de acuerdo con la presente divulgación.

30 En otros casos, el antígeno de ALK-1 es una célula que expresa o sobreexpresa ALK-1. En otros casos, el antígeno de ALK-1 es una proteína recombinante expresada de levadura, células de insecto, bacterias tales como *E. coli* u otros recursos por tecnología recombinante.

Inmunización

35 En algunos casos, los anticuerpos humanos se producen inmunizando un animal transgénico no humano que comprende dentro de su genoma algunos o todos los loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana con un antígeno ALK-1. En un caso preferido, el animal no humano es un animal XENOMOUSE®. (Abgenix, Inc., Fremont, CA).

40 Los ratones XENOMOUSE® son cepas de ratón modificadas por ingeniería que comprenden grandes fragmentos de los loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana y son deficientes en producción de anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green y col., Nature Genetics 7:13-21 (1994) y las patentes de Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Véanse también los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, y WO 00/037504.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar anticuerpos anti-ALK-1 a partir de animales no humanos, no murinos inmunizando animales transgénicos no humanos que comprenden los loci de inmunoglobulina humana con un antígeno ALK-1. Se pueden producir dichos animales usando los procedimientos descritos en los documentos citados anteriormente. Los procedimientos desvelados en estos documentos pueden modificarse como se describe en la patente de Estados Unidos 5.994.619. La patente de Estados Unidos 5.994.619 describe procedimientos para producir nuevas células y líneas celulares de masa celular interna cultivada (CICM), derivadas de cerdos y vacas, y células CICM transgénicas en las que se ha insertado ADN heterólogo. Las células transgénicas CICM pueden usarse para producir embriones, fetos, y descendencia transgénica clonada. La patente
50 '619 también describe procedimientos para producir animales transgénicos que son capaces de transmitir el ADN heterólogo a su descendencia. En casos preferidos de la presente divulgación, los animales no humanos son mamíferos, particularmente ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas, caballos o gallinas.

55 Los ratones XENOMOUSE® producen un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y generan anticuerpos humanos específicos de antígeno. En algunos casos, los ratones XENOMOUSE® contienen aproximadamente el 80 % del repertorio del gen V de anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos de configuración de la línea germinal con un tamaño de megabases de los loci de cadena pesada humana y los loci de cadena ligera kappa en cromosoma artificial de levaduras (YAC). En otros casos, los ratones XENOMOUSE®

contienen adicionalmente aproximadamente todos los locus de cadena ligera lambda humana. Véase Mendez y col., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), y el documento WO 98/24893.

5 En algunos casos, los animales no humanos que comprenden los genes de inmunoglobulina humana son animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno se mimetiza a través de la inclusión de genes individuales del locus Ig. Por tanto, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante mu, y un segundo dominio constante (preferentemente un dominio constante gamma) en una construcción para su inserción en un animal. Este enfoque se describe, *inter alia*, en las patentes de Estados Unidos n° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 10 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, y 5.643.763.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar anticuerpos humanizados anti-ALK-1. En algunos casos, los animales no humanos se inmunizan con un antígeno ALK-1 como se describe a continuación en condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se aíslan de los animales, y se aíslan los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-ALK-1 de interés a partir de las células productoras de anticuerpo aisladas o a partir de una línea celular inmortalizada producida a partir de dichas células. Dichos ácidos nucleicos se modifican por ingeniería posteriormente usando técnicas conocidas para los especialistas en la técnica y como se describe adicionalmente a continuación para reducir la cantidad de secuencia no humana, es decir, para humanizar el anticuerpo para reducir la respuesta inmune en seres humanos.

20 La inmunización de animales puede ser por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los procedimientos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, vacas y caballos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra, y la patente de Estados Unidos 5.994.619. En un caso preferido, el antígeno ALK-1 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Adyuvantes a modo de ejemplo incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos de inmunoestimulación). Dichos adyuvantes pueden proteger al polipéptido de la rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped a secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferentemente, si se está administrando un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones de los polipéptidos, repartidas durante varias semanas. El Ejemplo 2 ejemplifica un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 en ratones XENOMOUSE®.

Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

Después de la inmunización de un animal con un antígeno ALK-1, pueden obtenerse anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos a partir del animal. En algunos casos, se obtiene suero que contiene anticuerpos anti-ALK-1 del animal exanguinando o sacrificando al animal. El suero puede usarse según se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero, o pueden purificarse los anticuerpos anti-ALK del suero.

En algunos casos, se preparan líneas celulares productoras de anticuerpo a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y se inmortalizan los ganglios linfáticos y/o los linfocitos B esplénicos por cualquier medio conocido en la técnica. Los procedimientos para inmortalizar células incluyen, aunque sin limitación, transfectarlas con oncogenes, infectándolas con un virus oncogénico y cultivándolas en condiciones que seleccionen las células inmortalizadas, sometiéndolas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionándolas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivando un gen supresor tumoral. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. Si se usa fusión con célula de mieloma, las células de mieloma preferentemente no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Las células inmortalizadas se exploran usando ALK-1, o una parte del mismo. En un caso preferido, la exploración inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de exploración ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504.

Las células productoras de anticuerpo anti-ALK-1, por ejemplo, hibridomas, se seleccionan, se clonan y exploran adicionalmente para las características deseables, incluyendo un crecimiento robusto, una elevada producción de anticuerpos y características deseables de los anticuerpos, como se analiza adicionalmente a continuación. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de un sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los procedimientos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

En un caso preferido, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana y los linfocitos B esplénicos se fusionan a una línea celular de mieloma de la misma especie que el animal no humano. En un caso más preferido, el animal inmunizado es un ratón XENOMOUSE® y la línea celular de mieloma es un mieloma de ratón no secretor. En un caso incluso más preferido, la línea celular de mieloma es P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 2.

Por tanto, en un caso, la divulgación proporciona procedimientos para producir una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento del mismo dirigido contra ALK-1 que comprende (a) inmunizar un animal transgénico no humano descrito en el presente documento con ALK-1, una parte de ALK-1 o una célula o tejido que expresa ALK-1; (b) permitir que el animal transgénico monte una respuesta inmune contra ALK-1; (c) aislar células productoras de anticuerpo a partir del animal transgénico; (d) immortalizar las células productoras de anticuerpo; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células productoras de anticuerpo immortalizadas; y (f) explorar las células productoras de anticuerpo immortalizadas para identificar un anticuerpo dirigido contra ALK-1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una línea celular que produce un anticuerpo humano anti-ALK-1. En algunos casos, la línea celular es una línea celular de hibridoma. En algunos casos, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se ha descrito anteriormente. En otros casos, los hibridomas se producen en una especie no humana, no murina tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otro caso, los hibridomas son hibridomas humanos.

En otro caso, se inmuniza un animal transgénico con un antígeno ALK-1, se aíslan las células primarias, por ejemplo, bazo o linfocitos b de sangre periférica, de un animal transgénico inmunizado y se identifican las células individuales que producen anticuerpos específicos para el antígeno deseado. Se aísla el ARNm poliadenilado de cada célula individual y se realiza reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores con sentido que hibridan con secuencias del dominio variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayoría o todas las regiones FR1 de los genes de dominio variable de cadena pesada y ligera humana y cebadores anti-sentido que hibridan con secuencias de la región constante o de unión. Los ADNc de los dominios variables de cadena pesada y ligera después se clonan y expresan en cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con las regiones constantes de inmunoglobulina respectivas, tales como la cadena pesada y los dominios constante κ o λ . Véase Babcock, J.S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996. Los anticuerpos anti-ALK-1 después pueden identificarse y aislarse como se describe en el presente documento.

En otro caso, pueden usarse técnicas de presentación en fagos para proporcionar bibliotecas que contengan un repertorio de anticuerpos con afinidades variables por ALK-1. Para la producción de dichos repertorios, es innecesario immortalizar los linfocitos T del animal inmunizado. En su lugar, pueden usarse linfocitos B primarios directamente como fuente de ADN. La mezcla de ADNc obtenida del linfocito B, por ejemplo, derivado de bazo, se usa para preparar una biblioteca de expresión, por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos transfecteda en *E. coli*. Las células resultantes se ensayan para la inmunoreactividad contra ALK-1. Las técnicas para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad a partir de dichas bibliotecas se describen por Griffiths y col., EMBO J., 13:3245-3260 (1994); Nissim y col., ibid, pág. 692-698 y por Griffiths y col., ibid, 12:725-734.

Finalmente, se identifican los clones de la biblioteca que producen afinidades de unión de una magnitud deseada por el antígeno y se recupera el ADN que codifica el producto responsable de dicha unión y se manipula para expresión recombinante convencional. Las bibliotecas de presentación en fagos también pueden construirse usando secuencias de nucleótidos previamente manipuladas y se exploran de un modo similar. En general, los ADNc que codifican cadenas pesada y ligera se aportan independientemente o ligan para formar análogos Fv para la producción en la biblioteca de fagos.

La biblioteca de fagos después se explora para los anticuerpos con las afinidades superiores por ALK-1 y se recupera el material genético del clon apropiado. Rondas posteriores de exploración pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado.

Ácidos nucleicos, vectores, células huésped, y procedimientos recombinantes para preparar anticuerpos

Ácidos nucleicos

La presente divulgación también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-ALK-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-ALK-1. En otros casos, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-ALK-1.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera (V_L) usa un gen V_{κ} A27, A2, A1, A3, B3, B2, L1 o L2, y un gen JK5, JK1, JK3 o JK4 humano. En algunos casos la molécula de ácido nucleico usa un gen V_{κ} A27 humano y un gen JK5 humano. En otros casos, la molécula de ácido nucleico usa un gen A2 humano y un gen JK1 humano. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones a partir de la secuencia o secuencias de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones conservativas de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 sustituciones no conservativas en comparación con las secuencias V_{κ} y J_{κ} de la línea germinal. Las sustituciones pueden estar en las regiones CDR, las regiones flanqueantes o en el dominio constante.

- 5 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende una o más mutaciones en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las mutaciones de la línea germinal halladas en V_L de uno cualquiera de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1.
- 10 En algunos casos algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica al menos tres sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las mutaciones de la línea germinal halladas en V_L de uno cualquiera de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1.
- 15 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consta de las SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91 o 126, que codifica la secuencia de aminoácidos V_L del anticuerpo monoclonal 1.12.1(M29I/D19A), 1.11.1, 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.6.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; 5.59.1 o 1.12.1.
- 20 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92 o 127. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 3 o una parte de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de uno, dos o las tres CDR de dicho anticuerpo. En algunos casos, dicha parte codifica una región contigua de CDR1-CDR3 de la cadena ligera de un anticuerpo anti-ALK-1.
- 25 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_L que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos V_L de uno cualquiera de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1;1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o la secuencia de aminoácidos de la región V_L de la SEQ ID NO: 4. Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación incluyen ácidos nucleicos que hibridan en condiciones altamente rigurosas, tales como las descritas anteriormente, o que son al menos un 70 %,75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la región V_L de las SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92 o 126, o a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la región V_L de la SEQ ID NO: 4.
- 30
- 35 En otros casos preferidos, la molécula de ácido nucleico codifica el dominio variable de una cadena pesada (V_H) que usa una secuencia génica humana V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59 o una secuencia derivada de las mismas. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico usa un gen humano V_H 4-31, un gen DH6-19 y un gen humano JH4B.
- 40 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes humanos V, D o J. En algunos casos, dichas mutaciones están en la región V_H . En algunos casos, dichas mutaciones están en las regiones CDR.
- 45 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia V_H que comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia V_H de la línea germinal que son idénticas a las mutaciones de aminoácidos halladas en V_H de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En algunos casos, el ácido nucleico codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de la línea germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácidos halladas en uno de los anticuerpos monoclonales enumerados anteriormente.
- 50 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, o 103, que codifican la secuencia de aminoácidos V_H del anticuerpo monoclonal 1.12.1(M29I/D19A), 1.11.1, 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; 5.59.1 o 1.12.1.
- 55 En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90 o 104. En diversos casos preferidos, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 o 95. En algunos casos, dicha parte codifica la región V_H , una región CDR3, las tres regiones CDR, o una región contigua que incluye CDR1-CDR3.
- En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_H que es al menos un 70

5 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos V_H en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90 o 104. Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación incluyen ácidos nucleicos que hibridan en condiciones altamente rigurosas, tales como las descritas anteriormente, o que son al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90, 100 o 104, o a una región V_H de las mismas, o a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 85, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 95, 103, 128, o 129, o la secuencia de nucleótidos que codifica una región V_H de las mismas.

10 En otro caso, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1; o una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 o 95.

15 Puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-ALK-1 o partes del mismo a partir de cualquier fuente que produzca dicho anticuerpo. En diversos casos, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de un linfocito B que expresa un anticuerpo anti-ALK-1 aislado de un animal inmunizado con ALK-1 o de una célula inmortalizada derivada de dicho linfocito B. los procedimientos para aislar ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook J. y Russell D.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000). El ARNm puede aislarse y usarse para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la clonación de ADNc de genes de anticuerpo. En un caso preferido, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula de un animal transgénico no humano, produciendo dicha célula una inmunoglobulina humana. En un caso incluso más preferido, la célula productora de inmunoglobulina humana se aísla de un animal XENOMOUSE®. En otro caso, la célula productora de la inmunoglobulina humana se aísla de un animal transgénico no humano, no murino, como se ha descrito anteriormente. En otro caso, el ácido nucleico se aísla de un animal no humano, no transgénico. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no humano, no transgénico pueden usarse, por ejemplo, para anticuerpos humanizados que comprenden una o más secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humano anti-ALK-1 de la presente divulgación.

20 En algunos casos, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H de la divulgación unido en fase a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. Así mismo, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_L de la divulgación unido en fase a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

25 En un aspecto adicional de la divulgación, moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada (V_H) y/o ligera (V_L) se "convierten" en genes de anticuerpo de longitud completa. En un caso, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes de anticuerpo de longitud completa por inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios constantes de cadena pesada (C_H) o constante de cadena ligera (C_L), respectivamente, de modo que el segmento V_H esté ligado de forma funcional al segmento o segmentos C_H dentro del vector, y/o el segmento V_L esté ligado de forma funcional al segmento C_L dentro del vector. En otro caso, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se convierten en genes de anticuerpo de longitud completa uniendo, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio V_H y/o V_L a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L usando técnicas convencionales de biología molecular. Las secuencias de ácido nucleico de los genes de dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Publ. NIH nº 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud completa después pueden expresarse a partir de una célula en la cual se han introducido y aislarse el anticuerpo anti-ALK-1.

30 Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar de forma recombinante grandes cantidades de anticuerpos anti-ALK-1. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, inmunoadesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpo, como se describe adicionalmente a continuación. Si las moléculas de ácido nucleico se obtienen de un animal no humano, no transgénico, las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también como se describe a continuación.

35 En otro caso, se usa una molécula de ácido nucleico de la divulgación como sonda o cebador de PCR para una secuencia de anticuerpos específica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede usarse como sonda en procedimientos de diagnóstico o como un cebador de PCR para amplificar regiones de ADN que podrían usarse, inter alia, para aislar moléculas adicionales de ácido nucleico que codifiquen dominios variables de anticuerpos anti-ALK-1. En algunos

casos, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En algunos casos, los oligonucleótidos son de dominios altamente variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés. En algunos casos, los oligonucleótidos codifican todo o parte de una o más de las CDR de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1; o variantes de los mismos como se describe en el presente documento.

Vectores

La divulgación proporciona vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación o una parte de unión a antígeno del mismo. La divulgación también proporciona vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera de dichos anticuerpos o parte de unión a antígeno de los mismos. La divulgación proporciona adicionalmente vectores que comprenden molécula de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo, y sondas de los mismos.

En algunos casos, los anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación o partes de unión a antígeno se expresan insertando ADN que codifica cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa, obtenidas como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión de modo que los genes se ligan de forma funcional a secuencias necesarias de control de la expresión tales como secuencias de control de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas tales como el virus del mosaico de la coliflor, el virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV, y similares. El gen del anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplan su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con las células huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores diferentes. En un caso preferido, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión por procedimientos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes).

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia funcionalmente completa de inmunoglobulina humana C_H o C_L, con sitios de restricción apropiados modificados por ingeniería de modo que cualquier secuencia V_H o V_L pueda insertarse fácilmente y expresarse, como se ha descrito anteriormente. En dichos vectores, el corte y ajuste habitualmente sucede entre el sitio donante de corte y ajuste y la región J insertada y el sitio aceptor de corte y ajuste que precede al dominio C humano, y también en las regiones de corte y ajuste que existen dentro de los exones C_H humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción suceden en sitios cromosómicos nativos cadena debajo de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté ligado en fase al extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. Los especialistas en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen elevados niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador CMV), el virus 40 del simio (SV40) (tal como el promotor/potenciador SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AsMLP)), polioma y promotores fuertes de mamífero tales como promotores de inmunoglobulina y actina nativos. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y las secuencias de los mismos, véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n° 5.168.062, la patente de Estados Unidos n° 4.510.245 y la patente de Estados Unidos n° 4.968.615. Los procedimientos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.517.529. Los procedimientos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las cuales se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual se ha introducido el vector. Por ejemplo, los genes marcadores de selección incluyen el gen de la

dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato), el gen neo (para selección con G418), y el gen de la glutamato sintetasa.

Células huésped no de hibridoma y procedimientos para la producción recombinante de proteínas

5 Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-ALK-1 y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden usarse para transfección de una célula huésped adecuada de mamífero, vegetal, bacteriana o de levadura. La transformación puede ser por cualquier procedimiento conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del nucleótido o nucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero mediante vectores virales. Los procedimientos para transformar células son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos nº 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455. Los procedimientos para transformar células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los procedimientos para transformar células bacterianas y de levaduras son también bien conocidos en la técnica.

10 Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, inter alia, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células 293 Freestyle (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células renales de cría de hámster (BHK), células renales de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, HepG2), células A549, y otras varias líneas celulares. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan determinando que líneas celulares tienen elevados niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos convencionales de purificación de proteínas. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja acuática, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

20 Además, la expresión de anticuerpos de la divulgación a partir de líneas celulares de producción puede potenciarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de el gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque habitual para potenciar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se analiza por completo o parcialmente en relación a las patentes Europeas nº 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

25 Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferente glucosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, o que comprenden las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento son parte de la presente invención, independientemente de la glucosilación de los anticuerpos.

Animales y plantas transgénicos

30 Los anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación también pueden producirse de forma transgénica a través de la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo de una forma recuperable a partir de los mismos. En relación a la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos anti-ALK-1 pueden producirse en, y recuperarse de, la leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos nº 5.827.690, 6.756.687, 5.750.172, y 5.741.957.

35 En algunos casos, se inmunizan animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana con ALK-1 o una parte inmunogénica del mismo, como se ha descrito anteriormente. Los procedimientos para preparar anticuerpos en plantas se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6.046.037 y 5.959.177.

40 En algunos casos, se producen animales no humanos o plantas transgénicos introduciendo una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación en el animal o planta por técnicas transgénicas convencionales. Véase Hogan y la patente de Estados Unidos 6.417.429, *supra*. Las células transgénicas usadas para preparar el animal transgénico pueden ser células madre embrionarias o células somáticas o un óvulo fertilizado. Los organismos no humanos transgénicos pueden ser quiméricos, heterocigotos no quiméricos, y homocigotos no quiméricos. Véase, por ejemplo, Hogan y col., *Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual* 2ª ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson y col., *Mouse Genetics and Transgenics: A*

Practical Approach, Oxford University Press (2000); y Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999). En algunos casos, los animales no humanos transgénicos tienen una alteración y reemplazo dirigidos por una construcción de dirección que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de interés en una de interés. En un caso preferido, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y ligera que se unen específicamente a ALK-1, preferentemente a ALK-1 humano. En algunos casos, los animales transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-ALK-1 pueden prepararse en cualquier animal transgénico. En un caso preferido, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros fluidos corporales.

Bibliotecas de presentación en fagos

La divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, explorar la biblioteca con ALK-1 o una parte de unión a anticuerpo del mismo, aislar el fago que se une a ALK-1, y obtener el anticuerpo del fago. A modo de ejemplo, un procedimiento para preparar la biblioteca de anticuerpos para su uso en técnicas de presentación en fagos comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana con ALK-1 o una parte antigénica de la misma para crear una respuesta inmune, extraer las células productoras de anticuerpo del animal inmunizado; aislar el ARN que codifica las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de la divulgación desde las células extraídas, transcribir de forma inversa el ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc usando cebadores, e insertar el ADNc en un vector de presentación en fagos de modo que los anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos recombinantes anti-ALK-1 de la divulgación pueden obtenerse de este modo.

Los anticuerpos humanos recombinantes anti-ALK-1 de la divulgación pueden aislarse explorando una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos. Preferiblemente la biblioteca es una biblioteca de presentación en fagos de scFv, generada usando ADNc humanos de V_L y V_H preparados a partir del ARNm aislado de linfocitos B. Los procedimientos para preparar y explorar dichas bibliotecas son conocidos en la técnica. Están disponibles en el mercado kits para generar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n° catalog. 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos Stratagene SurfZAP™, n° catalog. 240612). También existen otros procedimientos y reactivos que pueden usarse para generar y explorar bibliotecas de presentación de anticuerpos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n° 6.223.409; las publicaciones PCT n° WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs y col., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay y col., Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85 (1992); Huse y col., Science 246:1275-1281 (1989); McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990); Griffiths y col., EMBO J. 12:725-734 (1993); Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992); Clackson y col., Nature 352:624-628 (1991); Gram y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580 (1992); Garrad y col., Bio/Technology 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom y col., Nuc. Acid Res. 19:4133-4137 (1991); y Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982 (1991).

En un caso, para aislar y producir anticuerpos humanos anti-ALK-1 con las características deseadas, primero se usa un anticuerpo humano anti-ALK-1 como se describe en el presente documento para seleccionar secuencias de cadena pesada y ligera que tienen actividad de unión similar hacia ALK-1, usando los procedimientos de sobreimpresión de epítopos descritos en la publicación PCT n° WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este procedimiento son preferentemente bibliotecas de scFv preparadas y exploradas como se describe en la publicación PCT n° WO 92/01047, McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990); y Griffiths y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv preferentemente se exploran usando ALK-1 humano como antígenos.

Una vez seleccionados los dominios humanos V_L y V_H iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y apareamiento", en los que se exploran diferentes pares de segmentos V_L y V_H inicialmente seleccionados para la unión a ALK-1 para seleccionar las combinaciones preferidas de pares V_L/V_H . Además, para mejorar adicionalmente la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H del par o pares V_L/V_H preferidos pueden mutarse aleatoriamente, preferentemente dentro de la región CDR3 de V_H y/o V_L , en un procedimiento análogo al proceso de mutación somática in vivo responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de la afinidad in vitro puede realizarse amplificando los dominios V_H y V_L usando cebadores de PCR complementarios a la CDR3 de V_H o la CDR3 de V_L , respectivamente, habiéndose creado los cebadores "con adiciones de" una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones de modo que los productos resultantes de PCR codifiquen los segmentos V_H y V_L en que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de V_H y/o V_L . Estos segmentos V_H y V_L mutados aleatoriamente pueden volver a explorarse para su unión a ALK-1.

Después de la exploración y aislamiento de un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación desde una biblioteca recombinante de presentación de inmunoglobulinas, pueden recuperarse los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado del paquete de presentación (por ejemplo, del genoma fágico) y subclonarse en otros vectores de expresión por técnicas convencionales de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico puede

manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la divulgación, como se describe a continuación. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por exploración de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células huésped de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

5 *Anticuerpos desinmunizados*

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo puede desinmunizarse para reducir su inmunogenicidad usando las técnicas descritas en, por ejemplo, las publicaciones PCT n° WO98/52976 y WO00/34317.

Anticuerpos mutados

10 En otra realización, las moléculas de ácido nucleico, los vectores y las células huésped pueden usarse para prepara anticuerpos anti-ALK-1 mutados. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, puede hacerse una mutación en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo por ALK-1, para aumentar o disminuir la k_{off} , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas en mutagénesis dirigida al sitio son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. y Ausubel y col., supra. En otro caso, se hacen una o más mutaciones en un resto de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en el anticuerpo monoclonal 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29/D19A); 1.12.1 (M29); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. Las mutaciones pueden hacerse en una región CDR o región flanqueante de un dominio variable, o en un dominio constante. En un caso preferido, las mutaciones se hacen en un dominio variable. En algunos casos, se hacen una o más mutaciones en un resto de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una región CDR o región flanqueante de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92 o 127, o cuya secuencia de ácido nucleico se presenta en la SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 95, 102 o 126.

En otro caso, la región flanqueante se muta de modo que la región o regiones flanqueantes resultantes tengan la secuencia de aminoácidos del correspondiente gen de la línea germinal. Puede hacerse una mutación en una región flanqueante o dominio constante para aumentar la semi-vida del anticuerpo anti-ALK-1. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n° WO 00/09560. También puede hacerse una mutación en una región flanqueante o dominio constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar propiedades tales como la fijación del complemento, la unión del FcR y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). De acuerdo con la divulgación, un único anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las CDR o regiones flanqueantes del dominio variable o en el dominio constante.

En algunos casos, hay de 1 a 13, incluyendo cualquier número intermedio, de mutaciones de aminoácido en cualquiera de los dominios V_H o V_L del anticuerpo anti-ALK-1 mutado en comparación con el anticuerpo anti-ALK-1 antes de la mutación. En cualquiera de los anteriores, las mutaciones pueden suceder en una o más regiones CDR. Además, cualquiera de las mutaciones pueden ser sustituciones conservativas de aminoácido. En algunos casos, existen no más de 5, 4, 3, 2, o 1 cambios de aminoácido en los dominios constantes.

Anticuerpos modificados

En otro caso, puede prepararse un anticuerpo de fusión o inmuno adhesina que comprende todo o una parte de un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación ligado a otro polipéptido. En un caso preferido, solamente los dominios variables del anticuerpo anti-ALK-1 están ligados al polipéptido. En otro caso preferido, el dominio V_H de un anticuerpo anti-ALK-1 está ligado a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo anti-ALK-1 está ligado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de un modo tal que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otro caso preferido, el dominio V_H está separado del dominio V_L por un adaptador tal que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí (véase a continuación en Anticuerpos de cadena sencilla). El anticuerpo V_H -adaptador- V_L después se liga al polipéptido de interés. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que están ligados dos (o más) anticuerpos de cadena sencilla entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente sobre una única cadena polipeptídica, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

Para crear un anticuerpo de cadena sencilla, (scFv) los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se ligan de forma funciona a otro fragmento que codifica un adaptador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse en forma de una proteína contigua de cadena sencilla, con los dominios V_L y V_H unidos por el adaptador flexible. Véase, por ejemplo, Bird y col., Science 242: 423-426 (1988); Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solamente se usan un único V_H y V_L , bivalente, si

se usan dos V_H y V_L , o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unan específicamente a ALK-1 y a otra molécula.

En otros casos, pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando las moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-ALK-1. Por ejemplo, pueden prepararse "anticuerpos kappa" (III y col., Protein Eng. 10: 949-57 (1997)), "minicuerpos" (Martin y col., EMBO J. 13: 5303-9 (1994)), "diacuerpos" (Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)), o "anticuerpos Janusin" (Traunecker y col., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) y Traunecker y col., Int. J. Cancer (Supl.) 7:51-52 (1992)) usando técnicas convencionales de biología molecular siguiendo los contenidos de la memoria descriptiva.

Pueden producirse anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno por una diversidad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o ligamiento de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny y col., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). Además, pueden formarse anticuerpos biespecíficos en forma de "diacuerpos" o "anticuerpos Janusin". En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se une a dos diferentes epítomos de ALK-1. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena ligera del anticuerpo monoclonal 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1 y una cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo adicionales. En algunos casos, la cadena ligera y cadena pesada adicionales también son de uno de los anticuerpos monoclonales identificados anteriormente, pero son diferentes de las primeras cadenas pesada y ligera.

En algunos casos, los anticuerpos modificados descritos anteriormente se preparan usando uno o más de los dominios variables o regiones CDR de un anticuerpo monoclonal humano anti-ALK-1 proporcionado en el presente documento.

Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno de la divulgación puede derivatizarse o ligarse a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o parte de los mismos se derivatizan de tal modo que la unión a ALK-1 no se ve afectada de forma adversa por la derivatización o marcaje. Por consiguiente, los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación pretenden incluir tanto formas intactas como modificadas de los anticuerpos humanos anti-ALK-1 descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación puede ligarse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una marca polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos adaptadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Los agentes de detección útiles con que puede derivatizarse un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la divulgación incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano rústico, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando se marca un anticuerpo con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede percibirse. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano rústico, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina, y detectarse a través de medición indirecta de unión a avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítomo polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas epitópicas). En algunos casos, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial de impedancia estérica.

Un anticuerpo anti-ALK-1 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semi-vida en suero.

Composiciones farmacéuticas y administración

La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de afecciones asociadas con angiogénesis aumentada indeseable en un mamífero, incluyendo un ser humano, que comprende una

cantidad de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, que es eficaz para tratar dichas afecciones, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos y partes de unión a antígeno de la presente divulgación pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa todo tipo de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo.

Las composiciones de la presente divulgación pueden estar en una diversidad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En un caso preferido, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otro caso preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con o sin un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la elevada concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo anti-ALK-1 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos o partes de anticuerpo de la presente divulgación pueden administrarse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo preferido de administración es infusión subcutánea, intramuscular, o intravenosa. Como apreciarán los especialistas en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

En ciertos casos, las composiciones de anticuerpo de la presente divulgación pueden prepararse con un vehículo que protegerá al anticuerpo contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dicha formulaciones son generalmente conocidos por los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

También pueden incorporarse compuestos activos adicionales en las composiciones. En ciertos casos, se co-formula un anticuerpo inhibidor anti-ALK-1 de la divulgación con y/o se co-administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen, sin limitación, anticuerpos que se unen a otras dianas, agentes anti-tumorales, agentes anti-angiogénesis, inhibidores de la transducción de señales, agentes anti-proliferativos, agentes quimioterapéuticos, o análogos peptídicos que inhiben anti-ALK-1. Dichas terapias de combinación pueden requerir dosificaciones inferiores del anticuerpo inhibidor anti-ALK-1 así como los agentes co-administrados, evitando de este modo las posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones de la presente divulgación opcionalmente pueden comprender adicionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable además de un agente quelante. Los antioxidantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, metionina, tiosulfato sódico, catalasa, y platino.

5 Por ejemplo, la composición puede contener metionina en una concentración que varía de 1 mM a aproximadamente 100 mM, y en particular, es aproximadamente 27 mM. Por ejemplo, una formulación acuosa puede ser: 10 mg/ml de anticuerpo anti-ALK-1, Histidina 20 mM, pH 5,5, 84 mg/ml de Trehalosa dihidrato, 0,2 mg/ml de Polisorbato 80, 0,05 mg/ml de EDTA disódico, 0,1 mg/ml de L-Metionina.

10 Las composiciones de la divulgación pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la divulgación. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de unión a antígeno puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que se compensa cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de unión a antígeno por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

20 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la divulgación está dictaminada por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del anticuerpo anti-ALK-1 o parte del mismo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para formar compuestos de dicho anticuerpo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

30 Un intervalo no limitante a modo de ejemplo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación es de 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente de 0,1-25, de 0,1 a 10 o de 0,1 a 3 mg/kg. En algunos casos, una formulación contiene 5 mg/ml de anticuerpo en un tampón de citrato sódico 20mM, pH 5,5, NaCl 140 mM, y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Debe apreciarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, deben ajustarse los regímenes específicos de dosificación en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son solamente a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

40 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona kits que comprenden un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno de la divulgación o una composición que comprende dicho anticuerpo o parte. Un kit puede incluir, además del anticuerpo o composición, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un procedimiento de diagnóstico o terapéutico. En un caso preferido, el kit incluye el anticuerpo o a composición que lo comprende y un agente de diagnóstico que puede usarse en un procedimiento descrito a continuación. En otro caso preferido, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden usarse en un procedimiento descrito a continuación.

Procedimientos diagnósticos de uso

50 Los anticuerpos anti-ALK-1 o partes de unión a antígeno de los mismos pueden usarse en procedimientos de diagnóstico para detectar ALK-1 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ALK-1 pueden usarse en un inmunoensayo convencional incluyendo, sin limitación, un ELISA, un RIA, citometría de flujo, inmunohistoquímica tisular, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación pueden usarse para detectar ALK-1 de seres humanos. Los anticuerpos anti-ALK-1 también pueden usarse para detectar ALK-1 de otros primates, por ejemplo monos cynomolgus.

La divulgación proporciona un procedimiento para detectar ALK-1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación y detectar el anticuerpo unido. En un caso, el anticuerpo anti-ALK-1 está directamente marcado con un marcador detectable. En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 (el primer anticuerpo) está sin marcar y se marca un segundo anticuerpo u otra molécula que puede

unirse al anticuerpo anti-ALK-1. Como saben bien los especialistas en la técnica, se elige un segundo anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a la especie particular y clase del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-ALK-1 es una IgG humana, entonces el anticuerpo secundario podría ser anti-IgG humana. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, ambas cuales están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Pierce Chemical Co.

Los marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se han analizado previamente, e incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En otros casos, ALK-1 puede ensayarse en una muestra biológica por un inmunoensayo de competición usando patrones de ALK-1 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-ALK-1 no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de ALK-1 marcados y el anticuerpo anti-ALK-1 se combinan y se determina la cantidad de patrón de ALK-1 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de ALK-1 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de ALK-1 marcado unido al anticuerpo anti-ALK-1.

Pueden usarse los inmunoensayos desvelados anteriormente para varios propósitos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ALK-1 pueden usarse para detectar ALK-1 en células cultivadas. En un caso preferido, los anticuerpos anti-ALK-1 se usan para determinar la cantidad de ALK-1 producido por células que se han tratado con diversos compuestos. Este procedimiento puede usarse para identificar compuestos que modulan los niveles de proteína ALK-1. De acuerdo con este procedimiento, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un periodo de tiempo mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si tiene que medirse el nivel total de ALK-1, las células se lisan y se mide el nivel total de ALK-1 usando uno de los inmunoensayos descritos anteriormente. El nivel total de ALK-1 en las células tratadas frente a las no tratadas se compara para determinar el efecto del compuesto de ensayo.

Un inmunoensayo preferido para medir los niveles totales de ALK-1 es citometría de flujo o inmunohistoquímica. Procedimientos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, transferencia de Western, inmunohistoquímica, marcaje de superficie celular de proteínas integrales de membrana e inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. Además, los inmunoensayos pueden aumentarse en escala para una exploración de alto rendimiento para ensayar una gran cantidad de compuestos para la activación o inhibición de la expresión de ALK-1.

Los anticuerpos anti-ALK-1 de la divulgación también pueden usarse para determinar los niveles de ALK-1 en un tejido o en células obtenidas del tejido. En algunos casos, el tejido es un tejido enfermo. En algunos casos del procedimiento, se escinde un tejido o una biopsia del mismo de un paciente. El tejido o biopsia entonces se usa en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, los niveles de ALK-1 total o la localización de ALK-1 mediante los procedimientos analizados anteriormente.

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden usarse *in vivo* para identificar tejidos y órganos que expresan ALK-1. Una ventaja de usar los anticuerpos humanos anti-ALK-1 de la presente divulgación es que pueden usarse de forma segura *in vivo* sin provocar una respuesta inmune sustancial contra el anticuerpo tras la administración, a diferencia de anticuerpos de origen no humano o con anticuerpos humanizados o quiméricos.

El procedimiento comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-ALK-1 marcado de forma detectable o una composición que los comprende a un paciente que necesita dicho ensayo de diagnóstico y someter al paciente a análisis de imágenes para determinar la localización de los tejidos que expresan ALK-1. El análisis de imágenes es bien conocido en la técnica médica, e incluye, sin limitación, análisis de rayos x, resonancia magnética (RM) o tomografía computarizada (TC). El anticuerpo puede marcarse con cualquier agente adecuado para formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, que puede usarse para análisis de rayos x, o un agente de contraste magnético, tal como un quelato de gadolinio, que puede usarse para RM o TC. Otros agentes de marcaje incluyen, sin limitación, radioisótopos, tales como ^{99}Tc . En otro caso, el anticuerpo anti-ALK-1 no estará marcado y se formarán imágenes administrando un segundo anticuerpo u otra molécula que sea detectable y que pueda unirse al anticuerpo anti-ALK-1. En un caso, se obtiene una biopsia del paciente para determinar si el tejido de interés expresa ALK-1.

Procedimientos terapéuticos de uso

En otro caso, la divulgación proporciona un procedimiento para inhibir la actividad ALK-1 administrando un anticuerpo anti-ALK-1 a un paciente que lo necesite. Cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento puede usarse terapéuticamente. En un caso preferido, el anticuerpo anti-ALK-1 es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En otro caso preferido, el anticuerpo anti-ALK-1 es un anticuerpo humano, y el paciente es un paciente humano. Como alternativa, el paciente puede ser un mamífero que

expresa ALK-1 con el cual el anticuerpo anti-ALK-1 reacciona de forma cruzada. El anticuerpo puede administrarse a un mamífero no humano que expresa ALK-1 con el cual el anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un mono cynomolgus) para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la presente divulgación.

- 5 En otro caso, puede administrarse un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de anticuerpo del mismo a un paciente que expresa niveles inapropiadamente elevados de ALK-1. El anticuerpo puede administrarse una vez, pero más preferentemente se administra múltiples veces. El anticuerpo puede administrarse desde tres veces al día hasta una vez cada seis meses o más. La administración puede ser en un programa tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo también puede administrarse de forma continua mediante una minibomba. El anticuerpo puede administrarse mediante una vía mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, o intratumoral. El anticuerpo puede administrarse una vez, al menos dos veces o durante al menos el periodo de tiempo hasta que la afección se trate, palie o cure. El anticuerpo generalmente se administra mientras esté presente la afección. El anticuerpo generalmente se administra como parte de una composición farmacéutica como se ha descrito *supra*. La dosificación del anticuerpo estará generalmente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, más preferentemente de 0,5 a 50 mg/kg, más preferentemente de 1 a 20 mg/kg, e incluso más preferentemente de 1 a 10 mg/kg. La concentración sérica del anticuerpo puede medirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica.
- 10
- 15
- 20 En un caso, el anticuerpo se administra en una formulación en forma de una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y que comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de tampón histidina, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, de aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de trehalosa, y de aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidrato.
- 25

Se contempla adicionalmente por la presente divulgación que pueda administrarse cualquiera de las composiciones del presente documento a un paciente susceptible a o que padece una afección asociada con angiogénesis aumentada ("una afección angiogénica").

- 30 Ejemplos de afecciones angiogénicas que pueden tratarse/prevenirse mediante las composiciones/procedimientos de la presente divulgación incluyen, aunque sin limitación, cáncer (tanto sólido como y hematológico), degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), anomalías en el desarrollo (organogénesis), ceguera diabética, endometriosis, neovascularización ocular, psoriasis, artritis reumatoide (AR), y decoloraciones cutáneas (por ejemplo, hemangioma, nevo flamígero, o nevo simple).

- 35 Por ejemplo, la presente divulgación se refiere a procedimientos para tratar o prevenir afecciones asociadas con neovascularización ocular usando cualquiera de las composiciones/procedimientos del presente documento. Las afecciones asociadas con neovascularización ocular incluyen, aunque sin limitación, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad ("DMRE"), glaucoma rubeótico, queratitis intersticial, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica (por ejemplo, células falciformes), miopía patológica, histoplasmosis ocular, pterigión, coroidopatía punteada interna, y similares.

40 Tratamiento del crecimiento celular anormal

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para el tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, incluyendo un ser humano, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, que es eficaz para tratar el crecimiento celular anormal.

- 45 En un caso de este procedimiento, el crecimiento celular anormal es cáncer, incluyendo, aunque sin limitación, mesotelioma, hepatobiliar (hepático y del conducto biliar), un tumor primario o secundario del SNC, un tumor cerebral primario o secundario, cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, gastrointestinal (gástrico, colorrectal, y duodenal), cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello del útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o el uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los anteriores cánceres.
- 50
- 55

- 5 En un caso preferido de la presente divulgación, el cáncer se selecciona entre cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer de la cabeza o el cuello, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer del riñón o el uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.
- En otro caso preferido de la presente divulgación, el cáncer se selecciona entre cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.
- 10 En otro caso de dicho procedimiento, dicho crecimiento celular anormal es una enfermedad proliferativa benigna, incluyendo, aunque sin limitación, psoriasis, hipertrofia protática benigna o reestenosis.
- 15 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para el tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, que es eficaz para tratar el crecimiento celular anormal en combinación con un agente anti-tumoral seleccionado entre el grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anticuerpos, citotóxicos, anti-hormonas, y anti-andrógenos.
- 20 La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, incluyendo un ser humano, que comprende una cantidad de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, que es eficaz para tratar el crecimiento celular anormal en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente anti-tumoral seleccionado entre el grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, y anti-andrógenos.
- 25 La divulgación también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, en combinación con un agente anti-tumoral seleccionado entre el grupo que consiste en agentes anti-proliferativos, inhibidores de quinasa, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de cox-I, inhibidores de cox-II, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, radiación, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anticuerpos, citotóxicos, anti-hormonas, estatinas, y anti-andrógenos.
- 30 En un caso de la presente divulgación el agente anti-tumoral usado junto con un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, es un agente anti-angiogénesis, inhibidor de quinasa, inhibidor de quinasa pan o inhibidor del factor de crecimiento. Los inhibidores preferidos de quinasa pan incluyen Sutent (Pfizer Inc., SU-11248), descrito en la patente de Estados Unidos nº 6.573.293 (Pfizer, Inc, NY, EEUU).
- 35 Los agentes anti-angiogénesis, incluyen aunque sin limitación los siguientes agentes, tales como inhibidor de EGF, inhibidores de EGFR, inhibidores de VEGF, inhibidores de VEGFR, inhibidores de TIE2, inhibidores de IGF1R, inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II), inhibidores de MMP-2 (metaloproteína de matriz 2), e inhibidores de MMP-9 (metaloproteína de matriz 9). Los inhibidores preferidos de VEGF, incluyen por ejemplo, Avastina (bevacizumab), un anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc. de South San Francisco, California.
- 40 Inhibidores adicionales de VEGF incluyen CP-547.632 (Pfizer Inc., NY, EEUU), Axitinib (Pfizer Inc.; AG-013736), ZD-6474 (AstraZeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171, VEGF Trap (Regeneron, Aventis), Vatalanib (también conocido como PTK-787, ZK-222584: Novartis & Schering AG), Macugen (pegaptanib octasodio, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/ Eyetech), IM862 (Cytran Inc. de Kirkland, Washington, EEUU); y angiozima, una ribozima sintética de Ribozima (Boulder, Colorado) y Chiron (Emeryville, California) y combinaciones de los mismos. Los inhibidores de VEGF útiles en la práctica de la presente divulgación se desvelan en las patentes de Estados Unidos nº 6.534.524 y 6.235.764.
- 45 Inhibidores particularmente preferidos de VEGF incluyen CP-547.632, AG13736, Vatalanib, Macugen y combinaciones de los mismos.
- 50 Se describen inhibidores adicionales de VEGF en, por ejemplo el documento WO 99/24440 (publicado el 20 de mayo de 1999), el documento WO1999/062890 (publicado el 9 de diciembre 1999), el documento WO 95/21613 (publicado el 17 de agosto de 1995), el documento WO 99/61422 (publicado el 2 de diciembre de 1999), la patente de Estados Unidos 6.534.524 (desvela AG13736), la patente de Estados Unidos 5.834.504 (expedida el 10 de noviembre de 1998), el documento WO 98/50356 (publicado el 12 de noviembre de 1998), la patente de Estados Unidos 5.883.113 (expedida el 16 de marzo de 1999), la patente de Estados Unidos 5.886.020 (expedida el 23 de marzo de 1999), la patente de Estados Unidos 5.792.783 (expedida el 11 de agosto de 1998), la patente de Estados Unidos nº
- 55

5 US 6.653.308 (expedida el 25 de noviembre de 2003), el documento WO 99/10349 (publicado el 4 de marzo de 1999), el documento WO 97/32856 (publicado el 12 de septiembre de 1997), el documento WO 97/22596 (publicado el 26 de junio de 1997), el documento WO 98/54093 (publicado el 3 de diciembre de 1998), el documento WO 98/02438 (publicado el 22 de enero de 1998), el documento WO 99/16755 (publicado el 8 de abril de 1999), y el documento WO 98/02437 (publicado el 22 de enero de 1998).

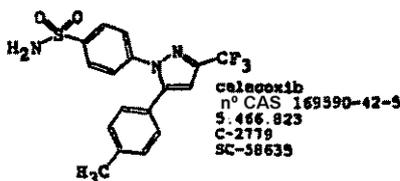
Otros agentes antiproliferativos que pueden usarse con los anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la presente divulgación incluyen inhibidores de la enzima farnesil proteína transferasa e inhibidores de los receptores tirosina quinasa PDGFr, incluyendo los compuestos desvelados y reivindicados en las siguientes patentes de Estados Unidos nº 6.080.769; 6.194.438; 6.258.824; 6.586.447; 6.071.935; 6.495.564; y 6.150.377.

10 Para inhibidores adicionales de PDGFR, véase el documento WO01/40217, publicado el 7 de julio de 2001 y el documento WO2004/020431, publicado el 11 de marzo de 2004. Los inhibidores preferidos de PDGFR incluyen CP-868.596 de Pfizer y sus sales farmacéuticamente aceptables.

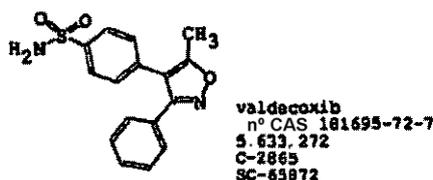
15 Los inhibidores preferidos de GARF incluyen AG-2037 de Pfizer (pelitrexol y sus sales farmacéuticamente aceptables). Los inhibidores de GARF útiles en la práctica de la presente divulgación se desvelan en la patente de Estados Unidos nº 5.608.082.

20 Ejemplos de inhibidores útiles de COX-II que pueden usarse junto con un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen CELEBREX™ (celecoxib), parecoxib, deracoxib, ABT-963, MK-663 (etoricoxib), COX-189 (Lumiracoxib), BMS 347070, RS 57067, NS-398, Bextra (valdecoxib), paracoxib, Vioxx (rofecoxib), SD-8381, 4-Metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol, 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol, T-614, JTE-522, S-2474, SVT-2016, CT-3, SC-58125 y Arcoxia (etoricoxib). Para inhibidores adicionales de COX-II, véanse las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos nº 2005-0148627 y 2005-0148777.

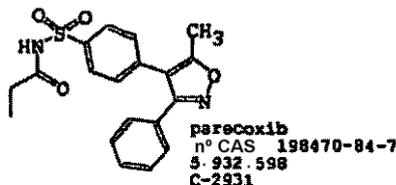
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es celecoxib, véase la patente de Estados Unidos nº 5.466.823. La estructura para Celecoxib se muestra a continuación:



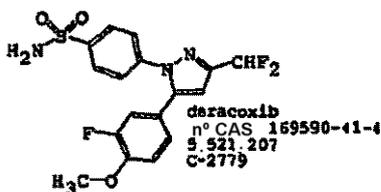
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es valecoxib, véase la patente de Estados Unidos nº 5.633.272. La estructura para valdecoxib se muestra a continuación:



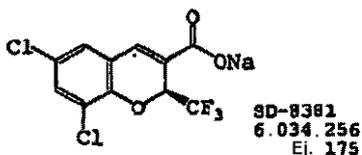
30 En un caso preferido, el agente anti-tumoral es parecoxib, véase la patente de Estados Unidos nº 5.932.598. La estructura para paracoxib se muestra a continuación:



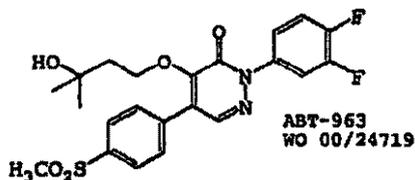
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es deracoxib, véase la patente de Estados Unidos nº 5.521.207. La estructura para deracoxib se muestra a continuación:



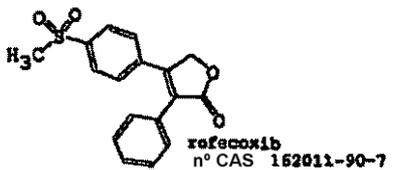
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es SD-8381, véase la patente de Estados Unidos n° 6.034.256. La estructura para SD-8381 se muestra a continuación:



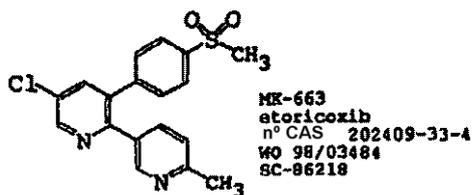
- 5 En un caso preferido, el agente anti-tumoral es ABT-963, véase la publicación internacional número WO 2002/24719. La estructura para ABT-963 se muestra a continuación:



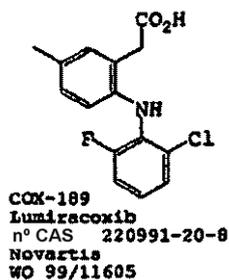
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es rofecoxib que se muestra a continuación:



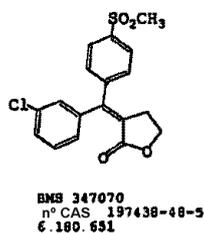
- 10 En un caso preferido, el agente anti-tumoral es MK-663 (etoricoxib), véase la publicación internacional número WO 1998/03484. La estructura para etoricoxib se muestra a continuación:



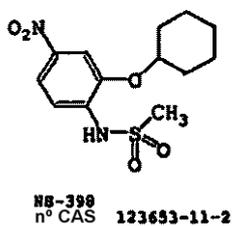
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es COX-189 (Lumiracoxib), véase la publicación internacional número WO 1999/11605. La estructura para Lumiracoxib se muestra a continuación:



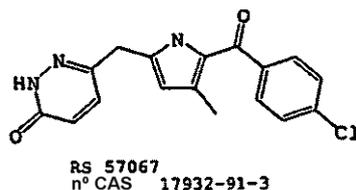
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es BMS-347070, véase la patente de Estados Unidos nº 6.180.651. La estructura para BMS-347070 se muestra a continuación:



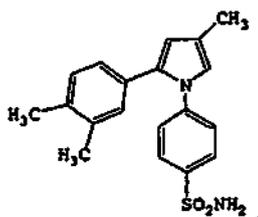
5 En un caso preferido, el agente anti-tumoral es NS-398 (CAS 123653-11-2). La estructura para NS-398 (CAS 123653-11-2) se muestra a continuación:



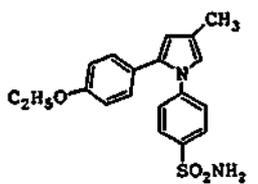
En un caso preferido, el agente anti-tumoral es RS 57067 (CAS 17932-91-3). La estructura para RS-57067 (CAS 17932-91-3) se muestra a continuación:



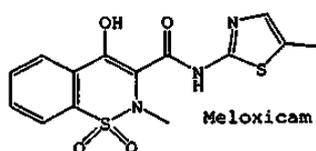
10 En un caso preferido, el agente anti-tumoral es 4-Metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol. La estructura para 4-Metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol se muestra a continuación:



En un caso preferido, el agente anti-tumoral es 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol. La estructura para 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol se muestra a continuación:



15 En un caso preferido, el agente anti-tumoral es meloxicam. La estructura para meloxicam se muestra a continuación:



Otros inhibidores útiles como agentes anti-tumorales usados junto con anticuerpos de la presente divulgación y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen aspirina, y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) que inhiben la enzima que crea las prostaglandinas (ciclooxigenasa I y II), que provoca niveles inferiores de prostaglandinas, incluyen aunque sin limitación las siguientes, Salsalato (Amigesic), Diflunisal (Dolobid),
 5 Ibuprofeno (Motrin), Ketoprofeno (Orudis), Nabumetona (Relafen), Piroxicam (Feldene), Naproxeno (Aleve, Naprosyn), Diclofenaco (Voltaren), Indometacina (Indocin), Sulindaco (Clinoril), Tolmetina (Tolectin), Etodolac (Lodine), Ketorolac (Toradol), Oxaprozina (Daypro) y combinaciones de los mismos. Los inhibidores preferidos de COX-I incluyen ibuprofeno (Motrin), nuprin, naproxeno (Aleve), indometacina (Indocin), nabumetona (Relafen) y combinaciones de los mismos.

10 Los agentes singularizados usados juntos con un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, y composiciones farmacéuticas de los mismos como se describe en el presente documento, incluyen inhibidores de EGFr tales como Iressa (gefitinib, AstraZeneca), Tarceva (erlotinib u OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.), Erbitux (cetuximab, Imclone Pharmaceuticals, Inc.), EMD-7200 (Merck AG),
 15 ABX-EGF (Amgen Inc. y Abgenix Inc.), HR3 (gobierno cubano), anticuerpos IgA (University of Erlangen-Nuremberg), TP-38 (IVAX), proteína de fusión de EGFR, vacuna de EGF, inmunoliposomas anti-EGFr (Hermes Biosciences inc.) y combinaciones de los mismos.

Los inhibidores preferidos de EGFr incluyen Iressa, Erbitux, Tarceva y combinaciones de los mismos.

La presente divulgación también se refiere a agentes anti-tumorales seleccionados entre inhibidores del receptor pan erb o inhibidores del receptor de ErbB2, tales como CP-724.714 (Pfizer, Inc.), CI-1033 (canertinib, Pfizer, Inc.),
 20 Herceptina (trastuzumab, Genentech Inc.), Omitarg (2C4, pertuzumab, Genentech Inc.), TAK-165 (Takeda), GW-572016 (lonafarnib, GlaxoSmithKline), GW-282974 (GlaxoSmithKline), EKB-569 (Wyeth), PKI-166 (Novartis), dHER2 (vacuna de HER2, Corixa y GlaxoSmith-Kline), APC8024 (vacuna de HER2, Dendreon), anticuerpo biespecífico anti-HER2/neu (Decof Cancer Center), B7.her2.IgG3 (Agensys), AS HER2 (Research Institute for Red Biology & Medicine), anticuerpos biespecíficos trifuncionales (University of Munich) y mAB AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc) y mAB 2B-1 (Chiron) y combinaciones de los mismos. Agentes anti-tumorales preferidos selectivos de erb
 25 incluyen Herceptina, TAK-165, CP-724.714, ABX-EGF, HER3 y combinaciones de los mismos. Los inhibidores preferidos del receptor pan erb incluyen GW572016, CI-1033, EKB-569, y Omitarg y combinaciones de los mismos.

Inhibidores adicionales de erbB2 incluyen aquellos del documento WO 98/02434 (publicado el 22 de enero de 1998), el documento WO 99/35146 (publicado el 15 de julio de 1999), el documento WO 99/35132 (publicado el 15 de julio
 30 de 1999), el documento WO 98/02437 (publicado el 22 de enero de 1998), el documento WO 97/13760 (publicado el 17 de abril de 1997), el documento WO 95/19970 (publicado el 27 de julio de 1995), la patente de Estados Unidos 5.587.458 (expedida el 24 de diciembre de 1996), y la patente de Estados Unidos 5.877.305 (expedida el 2 de marzo de 1999). Para inhibidores adicionales del receptor de ErbB2 útiles en la presente divulgación, véanse las patentes de Estados Unidos nº 6.465.449, y 6.284.764, y la solicitud internacional nº WO 2001/98277.

35 Además, pueden seleccionarse otros agentes anti-tumorales entre los siguientes agentes, Sorafenib (Onyx Pharmaceuticals Inc.; BAY-43-9006), Genasense (augmerosen, Genta), Panitumumab (Abgenix/Amgen), Zevalin (Schering), Bexxar (Corixa/GlaxoSmithKline), Abarelix, Alimta. EPO 906 (Novartis), discodermolida (XAA-296). ABT-510 (Abbott), Neovastat (Aeterna), enzastaurina (Eli Lilly), Combrestatina A4P (Oxigene), ZD-6126 (AstraZeneca), flavopiridol (Aventis), CYC-202 (Cyclacel), AVE-8062 (Aventis), DMXAA (Roche/Antisoma), Thymitaq (Eximias),
 40 Temodar (temozolomida, Schering Plough) y Revilimd (Celegene) y combinaciones de los mismos.

Pueden seleccionarse otros agentes anti-tumorales entre los siguientes agentes, CyPat (acetato de ciproterona), Histerelina (acetato de histrelina), Plenaixis (depósito de abarellx), Atrasentan (ABT-627), Satraplatino (JM-216), talomida (Talidomida), Teratope, Temilifeno (DPPE), ABI-007 (paclitaxel), Evista (raloxifeno), Atamestano (Biomed-777), Xyotax (poliglutamato paclitaxel), Targetina (bexarotina) y combinaciones de los mismos.

45 Además, pueden seleccionarse otros agentes anti-tumorales entre los siguientes agentes, Trizaona (tirapazamina), Aposyn (exisulind), Nevastat (AE-941), Ceplene (clorhidrato de histamina), Oratecina (rubitecan), Virulizina, Gastrimmune (G17DT), DX-8951f (mesilato de exatecan), Onconasa (ranpirnasa), BEC2 (mitumoab), Xcytrin (motexafina gadolinio) y combinaciones de los mismos.

Pueden seleccionarse agentes anti-tumorales adicionales entre los siguientes agentes, CeaVac (CEA), NeuTrexin (glucuronato de trimetresato) y combinaciones de los mismos. Pueden seleccionarse agentes anti-tumorales
 50 adicionales entre los siguientes agentes, OvaRex (oregovomab), Osidem (IDM-1), y combinaciones de los mismos. Pueden seleccionarse agentes anti-tumorales adicionales entre los siguientes agentes, Advexin (ING 201), Tirazona (tirapazamina), y combinaciones de los mismos. Pueden seleccionarse agentes anti-tumorales adicionales entre los siguientes agentes, RSR13 (efaproxiral), Cotara (131I chTNT 1/b), NBI-3001 (IL-4) y combinaciones de los mismos.
 55 Pueden seleccionarse agentes anti-tumorales adicionales entre los siguientes agentes, Canvaxina, vacuna de GMK, PEG Interon A, Taxoprexina (DHA/paclitaxel) y combinaciones de los mismos. Otros agentes anti-tumorales preferidos incluyen inhibidor PD325901 de MEK1/2 de Pfizer, inhibidor ARRY-142886 de MEK de Array Biopharm, inhibidor BMS-387.032 de CDK2 de Bristol Myers, inhibidor PD0332991 de CDK de Pfizer y AXD-5438 de AstraZeneca y combinaciones de los mismos. Además, también pueden usarse inhibidores de mTOR tales como

CCI-779 (Wyeth) y derivados de rapamicina RAD001 (Novartis) y AP-23573 (Ariad), inhibidores de HDAC SAHA (Merck Inc./Aton Pharmaceuticals) y combinaciones de los mismos. Agentes anti-tumorales adicionales incluyen inhibidor VX-680 de aurora 2 (Vertex), inhibidor XL844 de Chk1/2 (Exilixis).

5 Pueden usarse los siguientes agentes citotóxicos, por ejemplo, uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en epirrubicina (Elevance), docetaxel (Taxotere), paclitaxel, Zinecard (dexrazoxano), rituximab (Rituxan) mesilato de imatinib (Gleevec), y combinaciones de los mismos, junto con un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, y composiciones farmacéuticas del mismo, como se describe en el presente documento.

10 La divulgación también contempla el uso de los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación junto con terapia hormonal, incluyendo aunque sin limitación, exemestano (Aromasin, Pfizer Inc.), leuporelina (Lupron o Leuplin, TAP/Abbott/Takeda), anastrozol (Arimidex, Astrazeneca), gosrelina (Zoladex, AstraZeneca), doxercalciferol, fadrozol, formestano, citrato de tamoxifeno (tamoxifeno, Nolvadex, AstraZeneca), Casodex (AstraZeneca), Abarelix (Praecis), Trelstar, y combinaciones de los mismos.

15 La divulgación también se refiere a agentes de terapia hormonal tales como anti-estrógenos incluyendo, aunque sin limitación fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, letrozol (Femara, Novartis), anti-andrógenos tales como bicalutamida, flutamida, mifepristona, nilutamida, Casodex® (4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil) propionanilida, bicalutamida) y combinaciones de los mismos.

20 Además, la divulgación proporciona anticuerpos de la presente divulgación solo o en combinación con uno o más productos sanitarios de apoyo, por ejemplo, un producto seleccionado entre el grupo que consiste en Filgrastim (Neupogen), ondansetron (Zofran), Fragmin, Procrit, Aloxi, Emend, o combinaciones de los mismos.

Agentes citotóxicos particularmente preferidos incluyen Camptosar, Erbitux, Iressa, Gleevec, Taxotere y combinaciones de los mismos.

25 Los siguientes inhibidores de topoisomerasa I pueden usarse como agentes anti-tumorales camptotecina, irinotecano HCl (Camptosar), edotecarina, oratecina (Supergen), exatecano (Daiichi), BN-80915 (Roche) y combinaciones de los mismos. Los inhibidores de topoisomerasa II particularmente preferidos incluyen epirrubicina (Elevance).

Los anticuerpos de la divulgación pueden usarse con agentes antitumorales, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, agentes antitumorales derivados de plantas, derivados de camptotecina, inhibidores de tirosina quinasa, otros anticuerpos, interferones, y/o modificadores de la respuesta biológica.

30 Los agentes alquilantes incluyen, aunque sin limitación, N-óxido de mostaza de nitrógeno, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, busulfán, mitobronitol, carboquona, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, AMD-473, altretamina, AP-5280, apaziquona, brostalicina, bendamustina, carmustina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, mafosfamida, y mitolactol; los compuestos alquilantes coordinados con platino incluyen aunque sin limitación, cisplatinato, Paraplantino (carboplantino), eptaplantino, lobaplantino, nedaplantino, Eloxatina (oxaliplatinato, Sanofi) o satrplantino y combinaciones de los mismos. Los agentes alquilantes particularmente preferidos incluyen Eloxatina (oxaliplatinato).

40 Los antimetabolitos incluyen aunque sin limitación, metotrexato, ribósido de 6-mercaptopurina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo (5-FU) solo o en combinación con leucovorina, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, encitabina, S-1, Alimta (premetrexed disodio, LY231514, MTA), Gemzar (gemcitabina, Eli Lilly), fludarabina, 5-azacitidina, capecitabina, cladribina, clofarabina, decitabina, eflomitina, etinilcitudina, arabinósido de citosina, hidroxurea, TS-1, melfalán, nelarabina, nolatrexed, ocfosfato, premetrexed disodio, pentostatina, pelitrexol, raltitrexed, triapina, trimetrexato, vidarabina, vincristina, vinorelbina; o por ejemplo, uno de los antimetabolitos preferidos desvelados en la solicitud de patente europea nº 239362 tal como ácido N-(5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil)-L-glutámico y combinaciones de los mismos.

45 Los antibióticos incluyen antibióticos intercalantes aunque sin limitación: aclarrubicina, actinomicina D, amrubicina, annamicina, adriamicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, elsamitrucina, epirrubicina, galarrubicina, idarrubicina, mitomicina C, nemorrubicina, neocarzinostatina, peplomicina, pirarrubicina, rebeccamicina, estimalamer, estrepto-zocina, valrubicina, zinostatina y combinaciones de los mismos.

50 Las sustancias anti-tumorales derivadas de plantas incluyen por ejemplo aquellas seleccionadas entre inhibidores mitóticos, por ejemplo vinblastina, docetaxel (Taxotere), paclitaxel y combinaciones de los mismos.

55 Los agentes citotóxicos inhibidores de topoisomerasa incluyen uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en aclarrubicina, amonafide, belotecano, camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, diflomotecano, irinotecano HCl (Camptosar), edotecarina, epirrubicina (Elevance), etopósido, exatecano, gimatecano, lurtotecano, mitoxantrona, pirarrubicina, pixantrona, rubitecano, sobuzoxano, SN-38, taflupósido, topotecano, y combinaciones de los mismos.

Los agentes citotóxico preferidos inhibidores de topoisomerasa incluyen uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, irinotecano HCl (Camptosar), edotecarina, epirubicina (Elevance), etopósido, SN-38, topotecano, y combinaciones de los mismos.

5 Los agentes inmunológicos incluyen interferones y otros numerosos agentes inmunopotenciadores. Los interferones incluyen interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón, alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a, interferón gamma-1b (Actimmune), o interferón gamma-n1 y combinaciones de los mismos. Otros agentes incluyen filgrastim, lentinan, sizofilan, TheraCys, ubenimex, WF-10, aldesleuquina, alemtuzumab, BAM-002, dacarbazina, daclizumab, denileuquina, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab, imiquimod, lenograstim, lentinan, vacuna de melanoma (Corixa), molgramostim, OncoVAX-CL, sargramostim, tasonermin, tecleuquina, timalasina, tositumomab, Virulizina, Z-100, epratuzumab, mitumomab, oregovomab, pentumomab (Y-muHMFG1), Provenge (Dendreon) y combinaciones de los mismos.

15 Los modificadores de la respuesta biológica son agentes que modifican los mecanismos de defensa de los organismo vivos o las respuesta biológicas, tales como la supervivencia, el crecimiento, o la diferenciación de células tisulares para dirigirlos a que tengan actividad anti-tumoral. Dichos agentes incluyen krestina, lentinan, sizofiran, picibanil, ubenimex y combinaciones de los mismos.

Otros agentes anticancerosos incluyen alitretinoína, ampligen, atrasentan bexaroteno, bortezomib. Bosentan, calcitriol, exisulind, finasterida, fotemustina, ácido ibandronico, miltefosina, mitoxantrona, l-asparaginasa, procarbazona, dacarbazina, hidroxycarbamida, pegaspargasa, pentostatina, tazarotna, Telcyta (TLK-286, Telik Inc.), Velcade (bortezomib, Millenium), tretinoína, y combinaciones de los mismos.

20 Otros compuestos anti-angiogénicos incluyen acitretina, fenretinida, talidomida, ácido zoledrónico, angiostatina, aplidina, cilengtida, combretastatina A-4, endostatina, halofuginona, rebimastat, removab, Revlimid, squalamina, ukrain, Vitaxina y combinaciones de los mismos.

Los compuestos coordinados con platino incluyen aunque sin limitación, cisplantino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatin, y combinaciones de los mismos.

25 Los derivados de camptotecina incluyen aunque sin limitación camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, irinotecano, SN-38, edotecarina, topotecano y combinaciones de los mismos.

Otros agentes antitumorales incluyen mitoxantrona, l-asparaginasa, procarbazona, dacarbazina, hidroxycarbamida, pentostatina, tretinoína y combinaciones de los mismos.

30 También pueden usarse agentes anti-tumorales capaces de potenciar las respuestas inmunes antitumorales, tales como anticuerpos CTLA-4 (antígeno 4 de linfocitos citotóxicos), y otros agentes capaces de bloquear CTLA-4, tales como MDX-010 (Medarex) y compuestos CTLA-4 desvelados en la patente de Estados Unidos nº 6.682.736; y agentes anti-proliferativos tales como otros inhibidores de la farnesil proteína transferasa, por ejemplo inhibidores de la farnesil proteína transferasa. Para anticuerpos CTLA-4 específicos adicionales que pueden usarse en la presente divulgación véase la solicitud provisional de Estados Unidos 60/113.647 (presentada el 23 de diciembre de 1998), la patente de Estados Unidos nº 6.682.736. Por ejemplo, otro anticuerpo anti-CTLA-4 que puede usarse de acuerdo con la presente divulgación es ticilimumab, que tiene la secuencia del anticuerpo monoclonal 11.2.1 de la patente de Estados Unidos 6.682.736.

Para anticuerpos IGF1R específicos que pueden usarse en la presente divulgación, véase la solicitud de patente internacional nº WO 2002/053596.

40 Para anticuerpos CD40 específicos que pueden usarse en la presente divulgación, véase la solicitud de patente internacional nº WO 2003/040170.

También pueden emplearse agentes de terapia génica como agentes anti-tumorales tales como TNFerade (GeneVec), que expresa TNFalfa en response a radioterapia.

45 En un caso de la presente divulgación, pueden usarse estatinas junto con un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, y composiciones farmacéuticas del mismo. Pueden seleccionarse estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) entre el grupo que consiste en Atorvastatina (Lipitor, Pfizer Inc.), Pravastatina (Pravachol, Bristol-Myers Squibb), Lovastatina (Mevacor, Merck Inc.), Simvastatina (Zocor, Merck Inc.), Fluvastatina (Lescol, Novartis), Cerivastatina (Baycol, Bayer), Rosuvastatina (Crestor, AstraZeneca), Lovostatina y Niacina (Advicor, Kos Pharmaceuticals), derivados y combinaciones de los mismos.

50 En un caso preferido, la estatina se selecciona entre el grupo que consiste en Atovorstatina y Lovastatina, derivados y combinaciones de los mismos.

Otros agentes útiles como agentes anti-tumorales incluyen Caduet.

Para cualquiera de los procedimientos para tratar un trastorno hiperproliferativo o crecimiento celular anormal como se describe en el presente documento usando una combinación de un anticuerpo anti-ALK-1 o parte de unión a

antígeno con al menos un agente terapéutico adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 puede conjugarse, o derivatizarse, con el agente terapéutico adicional. El al menos un agente terapéutico adicional también puede administrarse por separado, o de un modo no derivatizado o no conjugado. Cuando el al menos un agente terapéutico adicional no está derivatizado o conjugado con el anticuerpo, puede administrarse dentro de la misma formulación farmacéutica que el anticuerpo, o puede administrarse en una formulación diferente.

Tratamiento de pérdida de visión

Los compuestos de la invención y las composiciones farmacéuticas que los contienen, son útiles para tratar la pérdida de visión severa causada por degeneración macular relacionada con la edad y otras enfermedades que afectan al segmento posterior del ojo, tales como neovascularización coroidea, retinopatía diabética, glaucoma, retinitis pigmentosa, y similares.

Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden usarse para formar un depósito de fármaco por detrás del ojo y pueden incluir uno o más agentes farmacéuticamente activos, además de uno o más excipientes no activos como se describe en el presente documento. Ejemplos de agentes farmacéuticamente activos útiles en las composiciones de la invención incluyen anti-infecciosos, incluyendo, sin limitación, antibióticos, antivirales, y antifúngicos; agentes antialérgicos y estabilizadores de mastocitos; agentes anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos (tales como nepafenaco); inhibidores de ciclooxigenasa, incluyendo, sin limitación, inhibidores de Cox I y Cox II; combinaciones de agentes anti-infecciosos y anti-inflamatorios; descongestivos; agentes anti-glaucoma, incluyendo, sin limitación, adrenérgicos, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, agonistas alfa-adrenérgicos, agentes parasimpatomiméticos, inhibidores de colinesterasa, inhibidores de la anhidrasa carbónica, y prostaglandinas; combinaciones de agentes anti-glaucoma; antioxidantes; suplementos nutricionales; fármacos para el tratamiento de edema macular cistoide incluyendo, sin limitación, agentes anti-inflamatorios no esteroideos; fármacos para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) incluyendo DMRE no exudativa (seca) y exudativa (húmeda), incluyendo, sin limitación, inhibidores de la angiogénesis, incluyendo inhibidores de la angiogénesis que inhiben los receptores proteína quinasa, incluyendo los receptores proteína quinasa que son receptores de VEGF; y suplementos nutricionales; fármacos para el tratamiento de infecciones herpéticas e infecciones oculares por CMV; fármacos para el tratamiento de vitreorretinopatía proliferativa incluyendo, sin limitación, antimetabolitos y fibrinolíticos; agentes moduladores de las heridas, incluyendo, sin limitación, factores de crecimiento; antimetabolitos; fármacos neuroprotectores, incluyendo, sin limitación, eliprodil; y esteroides angiostáticos para el tratamiento de enfermedades o afecciones del segmento posterior 26, incluyendo, sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) incluyendo DMRE no exudativa (seca) y exudativa (húmeda), neovascularización coroidea, retinopatías, retinitis, uveítis, edema macular, y glaucoma. Para información adicional sobre dichos esteroides angiostáticos véanse las patentes de Estados Unidos n° 5.679.666 y 5.770.592. Un anti-inflamatorio no esteroideo para el tratamiento de edema macular cistoide es nepafenaco.

Para la administración al ojo, se suministra un compuesto de la presente divulgación en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable de modo que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en la córnea y/o la esclerótica y las regiones internas del ojo, incluyendo, por ejemplo, la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, el iris/cuerpo ciliar, el cristalino, la coroides/retina y la esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser una pomada, aceite vegetal, o un material de encapsulación. Un compuesto de la divulgación también puede inyectarse directamente en el humor vítreo o el humor acuoso.

Además, un compuesto también puede administrarse por procedimientos aceptables bien conocidos, tales como inyecciones subtenoniana y/o subconjuntival. Como se sabe bien en la técnica oftálmica, la mácula está compuesta principalmente de conos retinianos y es la región de máxima agudeza visual en la retina. Una cápsula de Tenon o membrana de Tenon está dispuesta sobre la esclerótica. Una conjuntiva cubre un área corta del globo del ojo posterior al limbo (la conjuntiva bulbar) y se pliega arriba (el cul-de-sac superior) o abajo (el cul-de-sac inferior) para cubrir las áreas internas del párpado superior y el párpado inferior, respectivamente. La conjuntiva está dispuesta en la parte superior de la cápsula de Tenon. La esclerótica y la cápsula de Tenon definen la superficie exterior del globo ocular. Para el tratamiento de enfermedades oculares tales como degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) incluyendo DMRE no exudativa (seca) y exudativa (húmeda), neovascularización coroidea, retinopatías (tales como retinopatía diabética, retinopatía del prematuro), edema macular diabético, retinitis, uveítis, edema macular cistoide (EMC), glaucoma, y otras enfermedades o afecciones del segmento posterior del ojo, es preferente disponer un depósito de una cantidad específico de un agente oftálmicamente aceptable, farmacéuticamente activo directamente sobre la superficie exterior de la esclerótica y por debajo de la cápsula de Tenon. Además, en casos de degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) incluyendo DMRE no exudativa (seca) y exudativa (húmeda) y EMC es más preferente disponer el depósito directamente sobre la superficie externa de la esclerótica, por debajo de la cápsula de Tenon, y generalmente por encima de la mácula.

Los compuestos pueden formularse en forma de una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción larga pueden administrarse por implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular), inyección intramuscular o por la inyección subtenoniana o intravitreal mencionada anteriormente. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso.

Dentro de casos particularmente preferidos de la divulgación, los compuestos pueden prepararse para administración tópica en solución salina (combinada con cualquiera de los conservantes y agentes antimicrobianos habitualmente usados en preparaciones oculares), y administrarse en forma de colirio. La solución o suspensión puede prepararse en su forma pura y administrarse varias veces al día. Como alternativa, las presentes composiciones, preparadas como se ha descrito anteriormente, también pueden administrarse directamente a la córnea.

Dentro de casos preferidos, la composición se prepara con un polímero muco-adhesivo que se une a la córnea. Por tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados poco solubles, por ejemplo, en forma de una sal poco soluble.

Un vehículo farmacéutico para compuestos hidrófobos es un sistema codisolvente que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua, y una fase acuosa. El sistema codisolvente puede ser un sistema codisolvente VPD. VPD es una solución del 3 % p/v de alcohol bencílico, del 8 % p/v del tensioactivo no polar polisorbato 80, y del 65 % p/v de polietilenglicol 300, compensado al volumen en etanol absoluto. El sistema codisolvente VPD (VPD:5W) contiene VPD diluido 1:1 con un 5 % de dextrosa en solución acuosa. Este sistema codisolvente disuelve bien compuestos hidrófobos, y por sí mismo produce baja toxicidad tras administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema codisolvente pueden variarse considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes codisolventes puede variarse: por ejemplo, pueden usarse otros tensioactivos no polares de baja toxicidad en lugar de polisorbato 80; el tamaño de fracción de polietilenglicol puede variarse; otros polímeros biocompatibles pueden remplazar el polietilenglicol, por ejemplo polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir la dextrosa.

Alternativamente pueden emplearse otros sistemas de administración para los compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos conocidos de vehículos de administración o portadores para fármacos hidrófobos. También pueden emplearse algunos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque habitualmente al precio de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos pueden administrarse usando un sistema de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido varios materiales de liberación sostenida y son conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden liberar, dependiendo de su naturaleza química, los compuestos durante desde unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes adecuados en fase sólida o de gel. Algunos ejemplos de dichos portadores o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato cálcico, azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Cualquiera de las composiciones puede ser formulada para su administración a un individuo. Un individuo de la presente divulgación es preferiblemente un mamífero, o más preferiblemente un ser humano.

Las formulaciones farmacéuticas del presente documento pueden incluir adicionalmente un agente terapéutico elegido del grupo que consiste en:

un agente antineoplásico, un agente antiinflamatorio, un agente antibacteriano, un agente antivírico, un agente angiogénico y un agente antiangiogénico. Algunos ejemplos de dichos agentes se desvelan en el presente documento.

Por ejemplo, un agente antineoplásico puede elegirse del grupo que consiste en Clorhidrato de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramicina; Asparraginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfano; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de Carubicina; Carzelesin; Cedefingol; Cloramucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Clorhidrato de Epirubicina; Erbulozol; Clorhidrato de Esorrubicina; Estramustina; Fosfato Sódico de Estramustina; Etanidazol; Aceite Etiodizado I 131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinoida; Fluxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Fluorocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Imofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1b; Iproplatino; Clorhidrato de Irinotecan; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Clorhidrato de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalano; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico;

- Metoprina; Meturedepa; Mitinodomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper, Mitotano; Clorhidrato de Mitoxantrona; Ácido Mifofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatino; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Puposulfano; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfiromicina; Prednimustina;
- 5 Clorhidrato de Procarbazona; Puromicina; Clorhidrato de Puromicina; Pirazofurin; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina, Clorhidrato de Espirogermanio de; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur, Talisomicina; Taxanoe; Taxoide; Tecogalan Sódico; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Clorhidrato de Topotecan;
- 10 Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Trimetrexato Glucuronato; Triptorrelina; Clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredepa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinieurosina, Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Clorhidrato de Zorrubicina.
- 15 Un agente antiangiogénico es cualquier agente que inhibe la angiogénesis, tanto si se desvela en el presente documento como si es conocido en la técnica. En casos preferidos, un agente antiangiogénico es un agente anti-VEGF, tal como Macugen™ (Eyeteq, Nueva York, NI); o un anticuerpo anti-VEGF.
- Las composiciones farmacéuticas pueden formularse mediante técnicas convencionales usando uno o más portadores, excipientes y diluyentes adecuados. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, (19ª Ed. Williams & Wilkins, 1995).
- 20 Las formulaciones adecuadas para su administración parenteral incluyen formulaciones acuosas y no acuosas isotónicas con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir sistemas suspensores diseñados para dirigir el compuesto a los componentes sanguíneos o a uno o más órganos. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes precintados unidos o multidosis, por ejemplo, ampollas o
- 25 viales. Para las formulaciones intraoculares se prefieren las dosis unitarias porque no hay conservantes en la formulación. Para otras formulaciones parenterales pueden usarse conservantes, que proporcionarían recipientes multidosis.
- Pueden prepararse soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección, por ejemplo, a partir de polvos estériles. Las formas parenterales e intravenosas también pueden incluir minerales y otros materiales para hacerlas compatibles con el tipo de inyección o el sistema de administración elegido.
- 30 Las administraciones parenterales en particular contempladas por la presente divulgación incluyen las administraciones intraocular e intravítrea en el ojo. Las formulaciones farmacéuticas para la administración intraocular e intravítrea incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS) y solución salina isotónica equilibrada (BSS) con o sin excipientes tales como manitol o sorbitol como estabilizantes de las proteínas.
- 35 En general, agua, aceites adecuados, solución salina, dextrosa (glucosa) acuosa o soluciones azucaradas relacionadas y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son portadores adecuados para las soluciones parenterales. Las soluciones para su administración parenteral contienen preferiblemente una sal soluble en agua del principio activo, agentes estabilizantes adecuados y, si fuera necesario, sustancias tamponantes. Los agentes antioxidantes, tales como bisulfito sódico, sulfito sódico o ácido ascórbico, tanto solos como combinados, son unos
- 40 agentes estabilizantes adecuados. También se usan las sales del ácido cítrico de los mismos, o EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil o propilparabeno o clorobutanol. Algunos portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington, mencionado *supra*.
- 45 En cualquiera de los casos del presente documento, una composición o formulación farmacéutica del presente documento puede estar liofilizada.
- En cualquiera de los casos del presente documento, las formulaciones farmacéuticas preferibles tienen menos de aproximadamente 10, más preferiblemente menos de aproximadamente 5, más preferiblemente menos de aproximadamente 3, o más preferiblemente menos de aproximadamente 1 unidad(es) de endotoxina(s) por miligramo de agente terapéutico.
- 50 En algunos casos, los procedimientos de tratamiento desvelados en el presente documento incluyen adicionalmente administrar a un individuo que padece un trastorno antigénico uno o más agentes terapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste en agentes antineoplásicos, agentes antivíricos, agentes antiinflamatorios, agentes antibacterianos, agentes antiangiogénicos o agentes antiangiogénicos.
- Dichos tratamientos de combinación pueden conseguirse administrando a un individuo una coformulación de las
- 55 composiciones del presente documento con agente(s) terapéutico(s) adicional(es) como dos formulaciones farmacéuticas por separado. En casos en las que se administra más de una composición/agente terapéutico a un individuo, pueden usarse dosis menores de las composiciones y/o de los agentes terapéuticos como resultado del efecto sinérgico de ambos principios activos.

Algunos agentes antineoplásicos que pueden administrarse a un individuo incluyen, pero no se limitan a, Aclarrubicina; Clorhidrato de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramincina; Asparraginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfano; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer, Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de Carrubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Crisnatol Mesilato; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Epirubicina Clorhidrato de; Erbulozol; Esorubicina Clorhidrato de; Estramustina; Estramustina Fosfato Sódico; Etanidazol; Aceite Etiodizado I 131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinoida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Fluocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Oro Au 198 ; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Imofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b ; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1b; Iproplatino; Clorhidrato de Irinotecan; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Clorhidrato de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalano; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedopa; Mitinodomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; MitoEsper, Mitotano; Clorhidrato de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamincina; Ormaplatino; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromano; Pipsulfano; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfiromicina; Prednimustina; Clorhidrato de Procarbazona; Puomicina; Clorhidrato de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicinal, Clorhidrato de Espirogermanio; Espiromustina; Espiroplatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalan Sódico; Tegafur, Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfin; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Clorhidrato de Topotecan; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Trimetrexato Glucuronato; Triptorrelina; Clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredopa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinapidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Clorhidrato de Zorrubicina.

Algunos agentes antibacterianos que pueden administrarse a un individuo incluyen, pero no se limitan a, penicilinas, aminoglucósidos, macrólidos, monobactamas, rifamicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, imipenem, ácido fusídico, novobiocina, fosfomicina, fusidato sódico, neomicina, polimixina, capreomicina, colistimetato, colistina, gramicidina, minociclina, doxiciclina, vanomicina, bacitracina, kanamicina, gentamicina, eritromicina y cefalosporinas.

Algunos agentes antiinflamatorios que pueden administrarse a un individuo incluyen, pero no se limitan a, AINEs (por ejemplo, ácido acetilsalicílico (salicilamida), salicilamida sódica, indoprofeno, indometacina, indometacina sódica trihidratada, Bayer™, Bufferin™, Celebrex™, diclofenaco, Ecotrin™, diflunisal, fenoprofeno, naproxeno, sulindaco, Vioxx™), corticosteroides o corticotropina (ACTH), colchicina y acetato de anecortave.

Algunos agentes antivíricos que pueden administrarse a un individuo incluyen, pero no se limitan a, α -metil-P-adamantano metilamina, 1,-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3 carboxamida, 9-[2-hidroxi-etoxi] metilguanina, adamantanamina, 5-yodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferón, arabinósido de adenina, CD4, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 9-(2-hidroxi-etoximatil)-guanina (aciclovir), ácido fosfonofórmico, 1-adamantanamina, péptido T, y 2',3'didesoxicitidina.

La administración de una composición de la presente divulgación a una célula objetivo *in vivo* puede realizarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse sistémicamente o localmente mediante cualquier medio conocido en la técnica (por ejemplo, oralmente, intraocularmente, intravascularmente (i.v.), intradérmicamente, intramuscularmente, transdérmicamente, transmucosalmente, entéricamente, parenteralmente, mediante inhalanebulización iónica, rectalmente o tópicamente) en formulaciones de dosificación unitaria y que contienen portadores, coadyuvantes y vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables.

Según se usa en este documento, el término intraocularmente incluye intravitreamente, subretinalmente, y similares.

Según se usa en este documento, el término parenteral según se usa en este documento incluye subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, técnicas de infusión o intraperitonealmente. Los supositorios para la administración rectal del fármaco pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilenglicoles, que son sólidos en las temperaturas habituales pero líquidos a la temperatura rectal, y por lo tanto se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

El régimen de dosificación para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad con las composiciones de esta divulgación se basa en diversos factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente, la gravedad del estado, la vía de administración y el componente en particular. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede ser determinado rutinariamente usando procedimientos estándar.

Para su administración por vía sistémica, el anticuerpo anti-ALK-1 o la porción de unión al antígeno del mismo de la presente divulgación y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran preferiblemente a una dosis de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o 150 mg/kg de peso corporal. En otros casos, los polipéptidos (preferiblemente dímeros u homodímeros) y/o las moléculas pequeñas del presente documento se administran sistémicamente a una dosis de 0,1 - 100 mg/kg, más preferiblemente de 0,5 - 50 mg/kg, más preferiblemente de 1 - 30 mg/kg de peso corporal, o más preferiblemente de 5 - 20 mg/kg.

Para su administración localizada, el anticuerpo anti-ALK-1 o la porción de unión al antígeno del mismo de la presente divulgación y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran preferiblemente a una dosis de al menos 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg o 700 mg. En otros casos, los polipéptidos (preferiblemente dímeros u homodímeros) y/o las moléculas pequeñas del presente documento se administran localmente a una dosis de 50 - 1000 mg, más preferiblemente de 100 - 800 mg, más preferiblemente de 200 - 500 mg, o más preferiblemente de 300 - 400 mg por zona.

Por ejemplo, para su administración dérmica, el anticuerpo anti-ALK-1 o la porción de unión al antígeno del mismo de la presente divulgación y/o los peptidomiméticos y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran a una dosis de 50 - 1000 mg/cm², más preferiblemente de 100 - 800 mg/cm², o más preferiblemente de 200 - 500 mg/cm². En otro ejemplo, para su administración ocular, los polipéptidos y/o peptidomiméticos y/o las moléculas pequeñas de la presente divulgación se administran a una dosis de 50 - 1.000 mg/ojo, más preferiblemente de 100 - 800 mg/ojo, o más preferiblemente de 200 - 500 mg/ojo.

Las composiciones farmacéuticas preferibles incluyen el principio activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1) en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad eficaz para conseguir un beneficio terapéutico o profiláctico. La cantidad eficaz real para una aplicación en particular dependerá del estado que se va a tratar y de la vía de administración. La determinación de la cantidad eficaz está dentro de las habilidades del experto en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación del presente documento.

Preferiblemente, la cantidad eficaz del principio activo, por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1, es desde aproximadamente 0,0001 mg hasta aproximadamente 500 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal de un paciente, más preferiblemente desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 250 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal del paciente, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 100 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal del paciente, todavía aún más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 50 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal del paciente, y muy preferiblemente desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 15 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal del paciente.

En términos de porcentaje en peso, las formulaciones de la presente divulgación comprenderán preferiblemente el agente activo, por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1, en una cantidad de desde aproximadamente el 0,0001 hasta aproximadamente el 10 % en peso, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,001 hasta aproximadamente el 1 % en peso, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 hasta aproximadamente el 1 % en peso, o más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % en peso hasta aproximadamente el 0,5 % en peso.

Terapia génica

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la presente divulgación pueden ser administradas a un paciente en necesidad de las mismas a través de la terapia génica. La terapia génica puede ser *in vivo* o *ex vivo*. En un caso preferido, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera se administran a un paciente. En un caso preferido, las moléculas de ácidos nucleicos se administran de forma que se integren de forma estable en los cromosomas de los linfocitos B, ya que estas células están especializadas en la producción de anticuerpos. En un caso preferido, los precursores de los linfocitos B son transfectados o infectados *ex vivo* y trasplantados de nuevo en un paciente en necesidad de los mismos. En otro caso, los precursores de los linfocitos B u otras células son infectadas *in vivo* usando un virus conocido por infectar el tipo celular de interés. Los vectores típicos usados para la terapia génica incluyen liposomas, plásmidos y vectores víricos. Algunos ejemplos de vectores víricos son retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados. Después de de la infección ya sea *in vivo* o *ex vivo*, los niveles de expresión del anticuerpo pueden ser monitorizados tomando una muestra del paciente tratado y usando un inmunoensayo conocido en la técnica o analizado en el presente documento.

En un caso preferido, el procedimiento de la terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula aislada de ácido nucleico que codifica para la cadena pesada o para una porción de unión al antígeno de un

anticuerpo anti-ALK-1 y expresar la molécula de ácido nucleico. En otro caso, el procedimiento de terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula aislada de ácido nucleico que codifica para la cadena ligera o para una porción de unión al antígeno de un anticuerpo anti-ALK-1 y expresar la molécula de ácido nucleico. En un procedimiento más preferido, el procedimiento de terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula aislada de ácido nucleico que codifica para la cadena pesada o para la porción de unión al antígeno de la misma, y una molécula aislada de ácido nucleico que codifica para la cadena ligera o para la porción de unión al antígeno de un anticuerpo anti-ALK-1 de la divulgación, y expresar las moléculas de ácido nucleico. El procedimiento de la terapia génica también puede comprender la etapa de administrar otro agente terapéutico, tal como cualquiera de los agentes analizados previamente en relación con la terapia de combinación.

10 Procedimiento para el cribado de antagonistas o agonistas de la ALK-1

En un caso, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar si una sustancia inhibe la regulación por incremento de un gen objetivo específico secuencia abajo del de la ALK-1, el Id1, tal como, por ejemplo, el ensayo Taqman para el Id1 descrito en el Ejemplo 12. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra de células que expresan el Id1 con la sustancia, y determinar si se inhibe la expresión del Id1, en el que un nivel reducido de expresión del Id1 en la muestra de células que se ha puesto en contacto con la sustancia en comparación con una muestra de células de control es indicativo de que dicha sustancia inhibe la expresión del Id1. En un caso específico, la sustancia es un anticuerpo que se une al dominio extracelular de la ALK-1. En otro caso, la sustancia es una molécula pequeña. Según la divulgación, las células pueden expresar inherentemente tanto la ALK-1 como el Id1, tal como las HUVECs descritas en el Ejemplo 12, o que han sido transformadas o transfectadas con ADN que codifica para uno o ambos de estos. Se puede determinar la expresión del Id1, por ejemplo, mediante el uso del ensayo Taqman para el Id1 descrito en el Ejemplo 12.

Por el contrario, los activadores o agonistas también pueden ensayarse o usarse siguiendo el mismo tipo de procedimientos.

Con objeto de que esta divulgación se comprenda mejor, se establecen los siguientes ejemplos.

25 **Ejemplos**

En los siguientes ejemplos y preparaciones, "MW" significa peso molecular; "His-Tag" significa etiqueta C-terminal de polihistidina (6 x His) para una rápida purificación con una resina quelante de níquel y la detección con un anticuerpo anti-His (C-term); "BSA" significa albúmina sérica bovina; "EDTA" significa ácido etilendiaminotetraacético; "DMSO" significa dimetilsulfóxido; "MOPS" significa ácido 3-(N-morfolin) propanosulfónico; "MES" significa ácido 2-(N-morfolin) etansulfónico; "PBS" significa solución salina tamponada con fosfato; "dPBS" significa solución salina tamponada con Dulbecco; "HEMA" significa metacrilato de 2-hidroxietilo; "DMEM" significa medio de eagle modificado por Dulbecco; "FBS" significa suero bovino fetal; "NEAA" significa aminoácidos no esenciales; "HEPES" significa ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etansulfónico; y "DMF" significa dimetilformamida.

Ejemplo 1. Preparación inmunógena de ALK-1

35 Se clonó el ECD de la ALK-1 a partir del clon humano de longitud completa del ORF de la ALK-1 (Invitrogen, Clon ID IOH21048) mediante PCR usando el cebador directo 5'-ACGGCCCAGCCGGCCGACCCTGTGAAGCCGTCT (SEQ ID NO: 96) e inverso 5'-ACTAAGCTTTTAATGATGATGATGATGATGCTGGCCATCTGTTCCCG (SEQ ID NO: 97). El producto de la PCR se purificó, se trató con las enzimas de restricción SfiI y HindIII y se clonó en el sitio SfiI/HindIII del vector de expresión mamífero pSecTag2/Hygro (Invitrogen Inc., nº de catálogo V910-20). El clon se usó para transfectar transitoriamente células 293T con el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Applied Science, nº de catálogo 1814443) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sobrenadante del cultivo celular que contenía la proteína objetivo secretada se recogió 72 después de la transfección y se dejó unir a una resina de Ni-NTA (QIAGEN, nº de catálogo 30430) a 4°C hasta el día siguiente. Entonces la resina se lavó con un tampón que contenía Tris 20 mM a pH 8,0, imidazol 25 mM y cloruro sódico 300 mM. La proteína con la etiqueta de His se eluyó de la resina usando un tampón que contenía Tris 20 mM a pH 8,0, imidazol 300 mM y cloruro sódico 300 mM. Se usó una resina de intercambio catiónico CM Sepharose para purificar adicionalmente la proteína en fosfato sódico 20 mM (pH 7,0), y se recogió la fracción no unida que contenía la proteína objetivo. El tampón de la proteína se cambió por PBS o HEPES 10 mM, a pH 7,4, más cloruro sódico 150 mM mediante diálisis, y se concentró hasta 0,2 - 1 mg/ml con una pureza final > 90 %, valorada mediante gel SDS PAGE teñido con azul de gel Coomassie. La proteína ECD de la ALK-1 con la etiqueta de His estaba fuertemente glucosilada, con un MW aparente de 26 KDa, en comparación con un MW teórico de 11 KDa para la proteína. La proteína ECD de la ALK-1 con la etiqueta de His (SEQ ID NO: 98) se ha usado para la generación de hibridomas que producen anticuerpos anti-ALK-1 según se describe en el Ejemplo 2. Proteína ECD de la ALK-1 humana con la etiqueta de His: secuencia génica (la parte en minúsculas es la señal de secreción):

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggtccaggttccactggtagcgcggcccagccggccGACCCTGTGAAGC
 CGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGG
 GGGGCCTGGTGACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCAAGGAACATCGGGGCT
 GCGGGAACCTTGACACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGC
 GACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGAGCAG
 CCGGGAACAGATGGCCAGCATCATCATCATCAT (SEC ID N°: 99)

secuencia de proteínas:

DPVKPSRGLVLTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHY
 CCDSHLNHNHNSLVLEATQPPSEQPGTDGQHSHHHH (SEC ID N°: 98)

Ejemplo 2. Generación de hibridomas que producen anticuerpos anti-ALK-1

5 Se inmunizaron ratones de entre ocho y diez semanas de edad XENOMOUSE® en las almohadillas de sus patas
 traseras con 10 mg/ratón de quimera recombinante humana ALK-1/Fc (R&D Systems, Inc., n° de catálogo 370-AL) o
 con la proteína ECD de la ALK-1 con la etiqueta de His descrita en el Ejemplo 1. Esta dosis se repitió entre cinco y
 siete veces durante un período de tres a cinco semanas. Tres o cuatro días antes de la fusión se les administró a los
 10 ratones una inyección final del inmunógeno en PBS. Los linfocitos de los nódulos linfáticos de los ratones
 inmunizados se fusionaron con la línea celular de mieloma no secretora P3-X63-Ag8.653 mediante electrofusión
 celular (ATCC n° de catálogo CRL 1580), y estas células fusionadas se sometieron a una selección HA-DMEM
 según se describió previamente (DMEM / FBS al 15 % / 1 % de L-glutamina 200 mM / 1 % de 100 X de aminoácidos
 no esenciales / 1 % de 100 X de 10 U/ml de Pen/Estrep / IL-6 / 1 vial/litro de complemento de medio OPI más 0,5 x
 15 de HA (Azaserina-Hipoxantina, Sigma, n° de catálogo A9666)). Se recuperó un conjunto de hibridomas en el que
 todos segregaban anticuerpos IgG2 humanos específicos para la ALK-1.

Se usó el ensayo ELISA para detectar la unión de los anticuerpos. El inmunógeno se recubrió en la placa de
 microtitulación de 96 pocillos Immulon (placa NUNC-Immuno™ con superficie MaxiSorp™, Nalge Nunc International,
 n° de catálogo 439454) a 4 mg/ml tampón de bicarbonato sódico 50 mM durante una noche a 4 °C. Las placas se
 20 lavaron y después se bloquearon con PBS mediante la adición de Tween-20 al 0,1 % y albúmina sérica bovina al 0,5
 %. Se añadieron los anticuerpos a las placas de ELISA bloqueadas, se incubaron durante 1 hora y se lavaron con
 PBS con Tween-20. La unión se detectó mediante peroxidasa de rábano picante anti-IgG humana (Pierce, n° de
 catálogo 31420) seguido de la adición de ABTS (Pierce, n° de catálogo 37615). Las mediciones colorimétricas se
 realizaron a 405 nm en un lector de microplacas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices).

Se seleccionaron veinticinco hibridomas para un estudio adicional. Estos eran células individuales clonadas
 25 mediante una dilución limitante y a las que se le asignaron 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I / D19A); 1.12.1
 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1;
 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

La Línea Celular de Hibridoma de Ratón LN 15916 (el hibridoma 1.12.1) se depositó de acuerdo con los términos
 según el tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas,
 30 VA20110-2209 el 21 de junio de 2005. Al hibridoma 1.12.1 se le ha asignado el siguiente número de registro PTA-
 6808.

Ejemplo 3. Secuencias de los anticuerpos Anti-ALK-1

Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos según la divulgación, se clonaron ácidos nucleicos que
 35 codifican para fragmentos de la cadena pesada y ligera de los hibridomas que producían los anticuerpos
 monoclonales anti-ALK-1. La clonación y la secuenciación se realizaron mediante medios estándar.

Se aisló ARNm poli(A)⁺ usando un kit Fast-Track™ (Invitrogen) a partir de aproximadamente 2 X 10⁵ células de
 hibridoma para cada uno de los anticuerpos ALK-1. Se sintetizó el ADNc a partir del ARNm mediante el uso de
 cebadores aleatorios. El ADNc cebado aleatoriamente se amplificó mediante PCR usando cebadores del dominio
 40 variable específicos de la familia V_H humana o V_K humana junto con cebadores específicos para la región constante
 Cy2 humana, o una región constante C_K para amplificar la región variable del anticuerpo que incluye todas las
 regiones en marco (FRs) y las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Se obtuvieron las
 secuencias de ácidos nucleicos que codifican para transcritos de la cadena pesada y kappa ligera humana a partir
 de los hibridomas que producían anti-ALK-1 mediante la secuenciación directa de ambas hebras de los productos de
 45 la PCR. Las secuencias se analizaron usando un programa informático patentado de Abgenix' y la información de la
 secuencia disponible públicamente para los genes humanos V_H y V_K, el "directorio de secuencias V BASE", de
 mlinson y col., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Podrían obtenerse resultados
 idénticos usando el programa de alineación de secuencias disponibles públicamente por cualquier experto habitual

usando los programas informáticos MacVector y Geneworks.

Específicamente se clonó el anticuerpo completo de ALK-1, 1.12.1, en vectores de expresión como sigue:

Se aisló ARNm poli(A)⁺ usando un Mini kit RNeasy (Qiagen) y el ADNc sintetizado a partir del ARNm con el kit Advantage RT-for-PCR (BD Biosciences) usando un cebado con oligo(dT). El ADNc cebado con oligo(dT) para el clon 1.12.1 se amplificó usando los cebadores indicados en la Tabla 2. La amplificación se consiguió usando la Ultra polimerasa *Pfu* (Stratagene) y un motor PTC-200 DNA (MJ Research) con ciclación como sigue:

3'@95 °C; 25x (20"@95 °C, 30"@52 °C, 1'20"@72 °C); 10'@72 °C. La secuencia de los clones se verificó usando Grills 16th BDTv3, química 1/dGTP (Applied Biosystems Inc) y un analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems Inc). En el proceso de clonación de 1.12.1 V_H se introdujo una mutación silenciosa se introdujo en el 8^o codón, convirtiendo "GGC" en un "GGT." Se analizaron todas las secuencias mediante alineamientos con el "directorio de secuencias V BASE" (Tom-linson, y col., J. Mol. Biol., 227, 776 - 798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853 - 860 (1994); EMBO J., 14, 4628 - 4638 (1995).)

Tabla 2

Cebadores de amplificación de la cadena pesada y ligera usados para clonar el 1.12.1 completo			
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ NO	ID
4-61	tcttcaagcttgatctctagaagccgcccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCC 3'	105	
G1/2_FL_R	5' tctctgatcagaattcctaCTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC 3'	106	
A11	5' tcttcaagcttcccgggagccgcccaccATGGAAACCCAGCGCAGCTT 3'	107	
K_FL_R	5' tctttqatcaqaattctcaCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG 3'	108	

Las bases no hibridantes están en minúsculas

15 Ejemplo 4. Análisis de uso de genes y análisis del CDR

A partir de la secuencia de ácidos nucleicos y de la secuencia de aminoácidos predicha a los anticuerpos, se identificó el uso de los genes para cada cadena de anticuerpo. La Tabla 3 establece el uso de los genes de los clones de Hibridoma seleccionados de los anticuerpos según la divulgación.

Tabla 3

Uso del gen de la cadena pesada y ligera							
Clon	Línea germinal de la cadena pesada				Línea germinal de la cadena ligera Kappa		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _K	J _K
1.11.1	9	3-33	6-19	JH3B	11	L ¹	JK4
1.12.1	103	4-31	6-19	JH4B	126	A27	JK5
1.13.1	13	4-61	6-19	JH4B	15	A27	JK5
1.14.1	17	4-61	6-19	JH4B	19	A27	JK5
1.151.1	21	4-31	3-3	JH3B	23	B3	JK1
1.162.1	25	4-31		JH3B	27	A27	JK5
1.183.1	29	4-59	6-19	JH4B	31	L2	JK3
1.31.1		4-31	6-19	JH4B		A27	JK5
1.8.1	33	4-31	3-3	JH3B	35	B3	JK1
1.9.1	37	3-11	3-22	JH6B	39	A2	JK1
4.10.1	41	3-15	3-22	JH4B	43	A3	JK4
4.24.1	45	4-31	5-12	JH6B	47	A27	JK5
4.38.1	49	4-31	4-23	JH4B	51	B3	JK1
4.58.1	53	4-31	4-23	JH4B	55	A27	JK5
4.62.1	57	4-31	5-12	JH6B	59	A27	JK5
4.68.1	61	4-31	2-2	JH5B	63	A27	JK5
4.72.1	65	4-31	5-12	JH6B	67	A27	JK5
5.13.1	69	4-31		JH3B	71	A27	JK4
5.34.1	73	4-31		JH6B	75	A1	JK1
5.53.1	77	3-15	1-1	JH4B	79	B2	JK4
5.56.1	81	3-11	6-19	JH6B	83	A2	JK1
5.57.1	85	3-11	3-10	JH6B	87	A2	JK1
5.59.1	89	3-11	6-6	JH6B	91	A2	JK1

20

Se realizó una mutagénesis en las regiones V_H (M29I) y V_K (D19A) del clon 1.12.1 con los cebadores indicados en la

Tabla 4 y el kit QuickChange (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se verificó la secuencia de las variantes mutadas y se clonaron en vectores de expresión mediante procedimientos estándar.

Tabla 4

Oligonucleótidos mutágenos (secuencias de 5' a 3'):		
Cebador	Sentido	Antisentido
1.12.1 (D19A)	CTCCAGGGGAAAGAGAGCCACCCTCTCCTGTAGG (SEC ID N°: 109)	CCTACAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCCTG GAG (SEC ID N°: 110)
1.12.1 (M29I)	GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATACTAC (SEC ID N°: 111)	GTAGTATTCACCCACTGCTGATGGAGCCACC (SEC ID N°: 112)

Las mutaciones están indicadas en **negrita y subrayadas**.

5 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para el dominio variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5) y para el dominio variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 7) del anticuerpo 1.12.1 (M29I / D19A) se depositaron de acuerdo con los términos según el tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 el 14 de julio de 2005. A los depósitos se les han asignado los siguientes números de registro: ATCC N° PTA-6864 para *E. coli* DH5α que contiene el plásmido pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_H (M29I): UC 25502; y ATCC N° PTA-6865 para *E. coli* DH5α que contiene el plásmido pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_K (D19A): UC 25503.

10 Varios de estos anticuerpos humanos específicos anti-ALK-1 mostraron un patrón común en el CDR1 del dominio variable de la cadena pesada. Esto condujo a moléculas que usan los segmentos del gen V 4-31 o 4-61 de la cadena pesada. Las secuencias de FR1 y CDR1 correspondientes a las cadenas pesadas de estos anticuerpos se muestran en la Tabla 4A, alineadas frente a las secuencias de la línea germinal. Un guión (-) en la alineación indica un residuo idéntico al germinal. En todos los casos, el patrón GYYWS (SEQ ID NO: 136) en el extremo del CDR1 ha experimentado mutaciones somáticas para producir un nuevo patrón de secuencia, mediante lo que el residuo G se ha cambiado por un residuo ácido (D o E), y el residuo final S se ha cambiado por un N en 9 de los 12 ejemplos. La diversidad de secuencias en otras regiones de VH indica que probablemente éstas sean eventos de mutaciones somáticas independientes que conducen al mismo patrón de secuencia en el extremo del CDR1 de VH.

Tabla 4A

Patrones de secuencia de la cadena pesada del anticuerpo de ALK-1

Clon	gen V	gen D	gen J	FR1 QVQLQESGPGLVKPSQTL SL TCTVS (SEQ ID NO: 122)	CDR1 GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 123)
Línea germinal					
5.34.1	VH4-31	- NA -	JH6B	-----	----- D--N
4.58.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	----- D--N
4.38.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	----- D---
5.13.1	VH4-31	- NA -	JH3B	-----	----- D--N
1.162.1	VH4-31	- NA -	JH3B	----- I---	----- E---
4.72.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	----- E---
4.24.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	----- ND--N
4.62.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	----- D--N
1.31.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	----- D--N
1.12.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	--M--E--N
Línea germinal					
1.13.1	VH4-61	D6-19	JH4B	--H -----	----- D--N
1.14.1	VH4-61	D6-19 de	JH4B b	-----	----- D--N
				QVQLQESGPGLVKPS ETL SLTCTVS (SEQ ID NO: 124)	GGSVSSGGYYWS (SEQ ID NO: 125)

Ejemplo 5. Preparación de moléculas de 1.12.1 Fa

20 Se preparó el fragmento Fab de 1.12.1 (M29I / D19A) mediante la digestión de 1.12.1 (M29I / D19A) de IgG1 usando papaína. Se incubó el 1.12.1 (M29I / D19A) de IgG1 completo purificado con proteína A con papaína (VWR) a una proporción de 1:50 (papaína:proteína) en un tampón que contenía fosfato sódico 30 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM y cisteína 2 mM a 37°C durante 2 - 3 horas. Entonces la mezcla de la digestión se aplicó a una minicolumna de proteína A para eliminar la proteína completa no digerida y el fragmento Fc. El Fab no unido se recogió en el flujo

25 continuo. Entonces se usó una columna de exclusión por tamaños (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) para purificar adicionalmente la proteína Fab y para intercambiar el tampón con PBS. La endotoxina se eliminó aplicando la solución de proteínas a través de gel Detoxi (PIERCE) y a continuación en una columna de intercambio iónico Vivapure Mini Q (VivaScience). La proteína se filtró con un filtro de jeringa de 0,2 mm y se ensayó el nivel de endotoxina con un kit LAL pirogent (Cambrex). La proteína purificada final tenía una concentración de 2 - 3 mg/ml,

30 con un nivel de endotoxina < 0,1 UE/mg y una pureza > 95 %. El fragmento 1.12.1 (M29I / D19A) de Fab tiene un peso molecular de 47.347 en un estado no ha reducido según se muestra mediante espectrometría de masas por electrospray. El análisis de la secuenciación de Edman N-terminal confirmó la secuencia N-terminales de la cadena ligera de EIVLTQSPG (SEQ ID NO: 113) y la secuencia de la cadena pesada de QVQLQESG (SEQ ID NO: 114), respectivamente.

35 **Ejemplo 6. Determinación de los valores de avidéz de anticuerpos monoclonales humanos completos anti-ALK-1 mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando BIACORE™**

Las medidas de avidéz de los anticuerpos purificados anti-ALK-1 mediante resonancia de plasmón superficial usando el instrumento BIACORE™ 3000 se realizaron como sigue usando los protocolos del fabricante.

Para realizar los análisis cinéticos, se inmovilizaron la proteína de fusión humana recombinante ALK-1/Fc (hALK-1/Fc) y la proteína de fusión cinomóloga ALK-1/Fc (cALK-1/Fc) en celdas de flujo individuales de un chip sensor CM5 BIAcore usando un acoplamiento de amina rutinario. Las superficies se prepararon usando tampón de acetato 10 mM, pH 5,0 como tampón de inmovilización, y se consiguieron unas densidades de proteínas de 300 y 150 RU para las proteínas de fusión hALK-1/Fc y cALK-1/Fc, respectivamente. La desactivación de los ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar se realizó usando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. Se prepararon muestras de anticuerpos en tampón de análisis a unas concentraciones que varían desde 0,125 hasta 2 nM (se incluyó una solución 0 nM que comprende únicamente tampón de análisis como referencia cero). Las muestras se distribuyeron aleatoriamente y se inyectaron por duplicado durante 10 minutos cada una a través de las 4 celdas de flujo usando HBS-EP (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005 % de tensioactivo P20) como tampón de análisis. Se observó que las constantes de asociación eran independientes de los caudales desde 1 hasta 100 ml/min, lo que indicaba que no había limitación en el transporte de masa. Se usó un caudal de 25 ml/min para determinar los valores de la avidéz. La disociación del anticuerpo se monitorizó durante 10 minutos, regenerando la superficie con una inyección de 12 segundos de H₃PO₄ 100 mM (25 ml/min). Los datos en bruto se procesaron usando el paquete informático Scrubber (©BioLogic Software) y se analizaron usando el paquete informático CLAMP (©BioLogic Software). Los conjuntos de datos múltiples procedentes de una única superficie, seis conjuntos de datos a la vez, se ajustaron simultáneamente de forma global a un modelo de unión simple 1:1 Langmuir usando un valor de R_{max} variable común. La Tabla 5 indica los valores de avidéz para los anticuerpos representativos anti-ALK-1 de la presente divulgación. Los datos representados indican que los anticuerpos preparados según la divulgación poseen elevadas afinidades y unas fuertes constantes de unión para la ALK-1 humana.

Tabla 5

Determinación del valor de avidéz mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore)			
Clon	Avidéz de hALK-1/Fc (pM)	hALK-1/Fc k _{off} (1/s)	Avidéz de cALK-1/Fc (pM)
1.12.1 (M29I / D19A)	< 6,8	< 5,0 x 10 ⁻⁶	27
1.14.2	76	5,6 x 10 ⁻⁵	280
1.27.3	2,9	1,9 x 10 ⁻⁵	60
1.31.1	< 13	< 5,0 x 10 ⁻⁶	150
1.162.1	18	1,1 x 10 ⁻⁵	62
1.183.2	220	3,1 x 10 ⁻⁵	1800
4.24.2	70	4,4 x 10 ⁻⁵	430
4.38.1	100	4,0 x 10 ⁻⁵	150
4.58.2	40	1,6 x 10 ⁻⁵	130
4.62.1	9,6	7,6 x 10 ⁻⁵	19
4.68.2	86	3,8 x 10 ⁻⁵	320
4.72.2	73	3,4 x 10 ⁻⁵	280
5.13.3	91	6,3 x 10 ⁻⁵	190

1.12.1 (M29I / D19A) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que era el mAb recombinante expresado que contenía dos mutaciones específicas de aminoácidos (la metionina de la posición 29 de la cadena pesada sustituida por isoleucina, y el ácido aspártico de la posición 19 de la cadena ligera sustituida por alanina)

Ejemplo 7. Determinación de las constantes de afinidad (K_D) de variantes del anticuerpo monoclonal humano completo anti-ALK-1 1,12,1 mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando BIAcore™

Las medidas de avidéz de los anticuerpos purificados anti-ALK-1 mediante resonancia de plasmón superficial usando el instrumento BIAcore™ 3000 se realizaron como sigue usando los protocolos del fabricante.

Para realizar los análisis cinéticos, se inmovilizaron las variantes del anticuerpo monoclonal humano completo anti-ALK-1 1.12.1 en la capa de dextrano de un chip biosensor CM5 usando un acoplamiento de amina. Las superficies se prepararon usando tampón de acetato 10 mM, pH 5,0 como tampón de inmovilización, y se consiguieron unas densidades de proteínas de 3.500 - 4.800 RU. La desactivación de los ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar se realizó usando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. Se prepararon muestras de ALK-ECD monómero en tampón de análisis a unas concentraciones que variaban desde 2,63 hasta 640 nM (se incluyó una solución 0 nM que comprende únicamente tampón de análisis como referencia cero). Las muestras se distribuyeron aleatoriamente y se inyectaron durante 2 minutos cada una a través de las 4 celdas de flujo usando HBS-EP (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005 % de tensioactivo P20) como tampón de análisis. Se usó un caudal de 25 ml/min para determinar las constantes de afinidad. La disociación del monómero de ALK-ECD se monitorizó durante 10 minutos, regenerando la superficie con una inyección de 12 segundos de H₃PO₄ 100 mM (25 ml/min). Los datos en bruto se procesaron usando el paquete informático Scrubber (©BioLogic Software) y se analizaron usando el paquete informático CLAMP (©BioLogic Software). Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de unión simple 1:1 Langmuir. La Tabla 6 indica las mediciones de afinidad para las variantes del anticuerpo monoclonal humano anti-ALK-1 1.12.1 de la presente divulgación.

Tabla 6

Determinación de la constante de afinidad de la variante del mAb 1.12.1, K_D , mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore)			
Anticuerpo	Constante de asociación ($M^{-1} s^{-1}$)	Constante de disociación (s^{-1})	K_D (nM)
1.12.1	$1,9 \times 10^3$	$7,4 \times 10^{-5}$	39
1.12.1 (rWT)	$2,2 \times 10^3$	$5,8 \times 10^{-5}$	26
1.12.1 (D19A)	$2,6 \times 10^3$	$4,4 \times 10^{-5}$	17
1.12.1 (M29I)	$2,4 \times 10^3$	$9,1 \times 10^{-5}$	38
1.12.1 (M29I / D19A) (1) *	$2,2 \times 10^3$	$9,5 \times 10^{-5}$	43
1.12.1 (M29I / D18A) (2) *	$2,3 \times 10^3$	$8,4 \times 10^{-5}$	37

* Las dos constantes de afinidad de 1.12.1 (M29I / D19A) (1) y (2) se obtuvieron usando dos superficies separadas.

1.12.1 se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que se aisló a partir del hibridoma.

1.12.1 (rWT) se refiere a la variante del mAb.

- 5 1.12.1 que fue expresada mAb.1.12.1(M29I) recombinante se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante que contiene una única mutación específica de aminoácido era la metionina de la posición 29 de la cadena pesada sustituida por isoleucina.

1.12.1 (D19A) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante que contiene una única mutación específica de aminoácido era el ácido aspártico de la posición 19 de la cadena ligera sustituido por alanina.

- 10 1.12.1 (M29I / D19A) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácidos específicas (la metionina de la posición 29 de la cadena pesada sustituida por isoleucina, y el ácido aspártico de la posición 19 de la cadena ligera sustituida por alanina).

Ejemplo 8. Determinación de las constantes de afinidad (K_D) de anticuerpos monoclonales humanos completos anti-ALK-1 representativos mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando BIAcore™

- 15 Las medidas de afinidad (K_D y k_{off}) de los anticuerpos purificados anti-ALK-1 mediante resonancia de plasmón superficial usando el instrumento BIAcore™ 3000 se realizaron como sigue usando los protocolos del fabricante.

Para realizar los análisis cinéticos, se inmovilizaron mAbs purificados por afinidad sobre la capa de dextrano de un chip biosensor CM5 usando un acoplamiento de amina. Las superficies se prepararon usando tampón de acetato 10 mM, pH 5,0 como tampón de inmovilización, y se consiguieron unas densidades de proteínas de 200 - 400 RU. La desactivación de los ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar se realizó usando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. Se prepararon muestras de ALK-ECD monómero en tampón de análisis a unas concentraciones que variaban desde 3.125 - 400 nM (se incluyó una solución 0 nM que comprende únicamente tampón de análisis como referencia cero). Las muestras se distribuyeron aleatoriamente y se inyectaron por duplicado durante 2 minutos cada una a través de las 4 celdas de flujo usando HBS-EP (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005 % de tensioactivo P20) como tampón de análisis. Se observó que las constantes de asociación eran independientes de los caudales desde 1 hasta 100 ml/min, lo que indicaba que no había limitación en el transporte de masa. Se usó un caudal de 25 ml/min se usó para determinar las constantes de afinidad. La disociación del ALK-ECD monómero ALK-ECD se monitorizó durante 10 minutos, regenerando la superficie con una inyección de 12 segundos de H_3PO_4 100 mM (25 ml/min). Los datos en bruto se procesaron usando el paquete informático Scrubber (©BioLogic Software) y se analizaron usando el paquete informático CLAMP (©BioLogic Software). Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de unión simple 1:1 Langmuir. La Tabla 7 indica las mediciones de afinidad para los anticuerpos representativos anti-ALK-1 de la presente divulgación:

Tabla 7

Determinación de la constante de afinidad, K_D , para anticuerpos monoclonales representativos mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore)			
mAb	Constante de asociación ($M^{-1} s^{-1}$)	Constante de disociación (s^{-1})	K_D (nM)
1.12.1 (M29I / D19A)	$3,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{-4}$	25
1.31.1	$3,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^{-4}$	6,0
4.72.1	$3,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^{-5}$	0,8
Fab 1.12.1 (M29I / D19A)	$3,8 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{-4}$	22

El ALK-ECD monómero usado para generar los datos del Ejemplo 8 era una preparación diferente a la usada para generar los datos del Ejemplo 7.

5 1.12.1 (M29I / D19A) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que se expresó mAb recombinante que contiene las dos mutaciones específicas de aminoácidos mencionadas anteriormente (el ácido aspártico de la posición 19 de la cadena ligera sustituido por alanina. y la metionina de la posición 29 de la cadena pesada sustituida por isoleucina).

Fab 1.12.1 (M29I / D19A) se refiere a al fragmento Fab del mAb 1.12.1 (M29I / D19A) preparado mediante la digestión de 1.12.1 (M29I / D19A) de IgG1 usando papaína.

Ejemplo 9. Identificación de la selectividad de epítipo de los anticuerpos anti-ALK-1

10 Los experimentos de competición cruzada se realizaron usando el instrumento BIACORE™ 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J), siguiendo los protocolos del fabricante.

Se inmovilizó la quimera recombinante humana ALK-1/FC en la capa de dextrano de un chip biosensor CM5 usando un acoplamiento de amina. Los chips se prepararon usando tampón de acetato 10 mM a pH 5,0 como tampón de inmovilización y se consiguió una densidad de proteínas de 940 RU. La desactivación de los ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar se realizó usando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5,

15 Los mAbs purificados se diluyeron hasta una concentración de nM en tampón de análisis HBS-EP (HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005 % de Polisorbato 20). Se eligió un anticuerpo primario y después se inyectó a través de la celda de flujo durante 600 segundos a una tasa de 10 ml/min. Una vez completada la inyección, se eligió un anticuerpo secundario y se inyectó a través de la misma celda de flujo durante 600 segundos a una tasa de 10 ml/min. La superficie del sensor se regeneró mediante una inyección de 12 segundos de H₃PO₄ 100 mM (25 ml/min).

20 Después de la regeneración, el anticuerpo primario se inyectó de nuevo a través de la celda de flujo durante 600 segundos a una tasa de 10 ml/min. Una vez completada la inyección, se eligió un anticuerpo secundario diferente y se inyectó a través de la misma celda de flujo durante 600 segundos a una tasa de 10 ml/min. Una vez se había usado el conjunto completo de los 14 anticuerpos como anticuerpos secundario, se eligió un nuevo anticuerpo primario y se repitió el procedimiento con el nuevo anticuerpo primario. Estos procedimientos se realizaron hasta que se habían inyectado todas las combinaciones posibles de anticuerpos primarios y secundarios a través de la celda de flujo. Se consideró que la unión del anticuerpo secundario se producía así la respuesta total observada después de la inyección con ambos anticuerpo superaba a la observada para ambos valores umbrales posibles. Los valores umbrales se determinaron usando el mismo anticuerpo que el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario.

30 Mostrada en la Tabla 8, se creó una matriz de respuesta basada en si se observaba unión: - indica que no hay unión del anticuerpo secundario, x indica que se observó unión (la respuesta era mayor que los valores umbrales para los anticuerpos individuales). El agrupamiento de los clones que mostraron el mismo patrón de reactividad produce dos grupos de epítipo los con 1.11.1 en un grupo y todos los demás anticuerpos en el otro grupo.

Tabla 8. Matriz de respuesta de agrupamiento de epítomos BIAcore

mAb primario	mAb secundario													
	1.9.1	1.11.1	1.12.1 (M29/D19A)	1.27.3	1.31.1	1.162.1	1.183.2	4.24.2	4.38.1	4.58.2	4.62.1	4.68.2	4.72	5.13
1.9.1	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.11.1	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1.12.1 (M29/D19A)"		X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.27.3	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.31.1	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.162.1	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.183.2	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.24.2	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.38.1	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.58.2	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.62.1	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.68.2	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.72	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.13	-	X	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ejemplo 10. Aislamiento del gen de la ALK-1 de mono Cynomolgus

El gen de mono Cynomolgus ("Cyno") de la ALK-1 se extrajo partir de tejido pulmonar Cino. Basándonos en la secuencia génica publicada para la ALK-1 humana (registro del Genbank L17075), se diseñaron cebadores para amplificar mediante PCR la ALK-1 completa del Cynomolgus. El ARNm se preparó a partir de tejido pulmonar del Cynomolgus extirpado congelado (aprox. 1 g) usando el kit de purificación de ARNm (Ambion, nº de catálogo 1915) según las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribieron 200 ng del ARNm y se amplificaron mediante PCR usando el kit de RT-PCR OneStep (Qiagen, nº de catálogo 210210) usando oligos específicos del gen: 5'-AGCGGGCCCAGAGGGACCATG (SEQ ID NO: 115) (directo) y 5'-CAGAAAGGAATCAGGTGCTCCTGGGCTA (SEQ ID NO: 116) (inverso) a una temperatura de apareamiento de 61 °C. Se escindió un producto de la RT-PCR del tamaño apropiado (-1,5 Kb) y se purificó en gel de agarosa al 0,9 % después de una electroforesis, después se clonó TOPO- en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, nº de catálogo K4575-01). El inserto se secuenció para obtener la secuencia de nucleótidos del ORF de la ALK-1 del Cynomolgus. Las secuencias del nucleótido y del aminoácido traducido predicho se muestran en la SEQ ID NO: 93 y 94, respectivamente. Mientras que la porción citoplasmática del gen codifica para secuencias de proteínas idénticas entre Cino y humano, hay 5 aminoácidos de diferencia en el dominio extracelular (ECD, que incluye las posiciones 22-118) y 1 aminoácido de diferencia en el dominio transmembranal de la proteína. La identidad de secuencia del ECD entre el humano y el Cino es del 94,8 %. En la Figura 2 se muestra una alineación del ECD humano y primate.

Se usó un par de cebadores (directo: 5'- GATTATGGCCTTGGGCTCCCCCAGGAAA (SEQ ID NO: 117) e inverso: 5'-GGGCTATTGAATCACTTTAGGCTTCTCTGGACTGTTG) (SEQ ID NO: 118) para amplificar mediante PCR el gen completo de la ALK-1 de Cynomolgus.

Ejemplo 11. Determinación de las características de unión a la superficie celular y de la hibridación cruzada del primate mediante citometría de flujo (FACS)

Para generar líneas celulares que sobreexpresan la ALK-1, que pueden usarse para ensayar la afinidad de unión anti-ALK-1 usando citometría de flujo (FACS), se clonaron genes completos humanos, Cino y de rata de la ALK-1 en el vector de Invitrogen (nº de catálogo K6510-20) pADNc5/FRT/To TOPO y se transfectaron en células hospedadoras 293 Flp-In T-Rex (Invitrogen, nº de catálogo R780-07), respectivamente. Las selecciones se realizaron usando higromicina para obtener las líneas celulares estables finales. La sobreexpresión de las respectivas proteínas completas de la ALK-1 se consigue mediante una inducción con tetraciclina (2 mg/ml) a 37 °C/5 % de CO₂ durante 24 horas.

Los mAbs anti-ALK-1 se ensayaron para evaluar sus afinidades de unión a la ALK-1 de la superficie celular usando el ensayo de FACS, empleando células estables 293 que sobreexpresan las proteínas ALK-1. Las células se desprendieron usando tripsina-EDTA y se lavaron con PBS-SA frío. Después de de ser alicuotadas en placas de 96 pocillos, las células se bloquearon con suero y se incubaron con diferentes concentraciones de mAb específico durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-k humana conjugado con el fluoróforo R-PE, antes de ser analizadas usando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Se recogieron 10.000 eventos para cada muestra sin aplicar ninguna separación. En la Tabla 9 se muestra la media geométrica de cada programa de la muestra representada en función de la concentración de mAb y se calculó la K_D para cada mAb después de ajustar a un modelo de equilibrio en dos estados. Algunos ejemplos de experimentos equivalentes de FACS humanos y primates se muestran en la Figura 3.

40

Tabla 9

<u>Resultados de la afinidad de unión media (K_D) de anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 a la ALK-1 de la superficie celular humana o de Cino medida mediante FACS</u>		
Anticuerpo	K _D	
	Humano	(nM) Cino
1.12.1	6,7	2,0
1.27.1	3,7	2,2
1.162.1	5,6	3,0
4.38.1	9,3	3,4
4.58.1	14,0	6,7
4.72.1	6,4	3,8
5.13.1	3,2	1,6
1.31.1	3,2	1,7
4.24.1	7,6	3,1
4.62.1	2,3	0,78
4.68.1	8,4	9,0

Además, se demostró que 1.12.1, mediante el ensayo de FACS, tenía un entrecruzamiento o muy limitado con respecto a la rata ($K_D > 100$ nM) y se predice que tendrá un entrecruzamiento muy bajo con respecto a ratón en vista de la identidad de secuencia del 74 % y del 68 % del ECD de la ALK-1 de rata/humana y de ratón/humana, respectivamente).

- 5 También se usó el ensayo de FACS para determinar la K_D de las variantes recombinantes del mAb 1.12.1. En la Tabla 10 se muestran los resultados, que indican una afinidad de unión similar del anticuerpo recombinante.

Tabla 10

Resultados de la afinidad de unión media (K_D) de variantes del 1.12.1 (M29I / D19A) a la ALK-1 de la superficie celular humana o de Cino medida mediante FACS		
Anticuerpo	K_D (nM)	
	Humano	Cino
1.12.1	6,7	2,0
1.12.1 (rWT)	5,9	6,0
1.12.1 (M29I)	6,0	3,3
1.12.1 (D19A)	5,7	3,8
1.12.1 (M29I / D19A)	7,2	3,4
Fab 1.12.1 (M29I / D19A)	0,77	ND

- 10 1.12.1 se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que se aisló a partir del hibridoma.
 1.12.1 (rWT) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante.
 1.12.1 (M29I) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante que contiene una única mutación de aminoácido específica en la que la metionina de la posición 29 de la cadena pesada fue sustituida por isoleucina.
 1.12.1 (D19A) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante que contiene una única mutación de aminoácido específica en la que el ácido aspártico de la posición 19 de la cadena ligera fue sustituido por alanina.
 1.12.1 (M29I / D19A) se refiere a la variante del mAb 1.12.1 que fue expresada mAb recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácido específicas (la metionina de la posición 29 de la cadena pesada sustituida por isoleucina, y el ácido aspártico de la posición 19 de la cadena ligera sustituida por alanina).
 20 Fab 1.12.1 (M29I / D19A) se refiere al fragmento Fab del mAb 1.12.1 (M29I / D19A) preparado mediante la digestión de IgG1 1.12.1 (M29I / D19A) usando papaína.

Ejemplo 12. Ensayo Taqman para el Id1

- 25 Se sembraron HUVECs (Biowhittaker, n° de catálogo CC-2519) en placas de 24 pocillos, a 12.000 células/pocillo en 600 ml de medio HUVEC completo (kit EGM-2 Bullet, Biowhittaker, n° de catálogo CC-3162), y se dejaron crecer durante una noche. Al día siguiente las células eran normalmente confluyentes al 50 %. El medio completo se retiró y se añadieron 200 ml de medio de inanición Starvation Medium (EBM-2 únicamente con un 0,2 % de FBS). Las células se incubaron durante 2 h. Después las células se trataron con 40 ml de solución de anticuerpo en PBS. El Ab liofilizado fue reconstituido con PBS estéril. Finalmente, las células se trataron con un 1 % de FBS/medio basal (concentraciones finales) durante 30 minutos, el medio se retiró y las células se lisaron en 400 ml de tampón RTL (kit RNeasy 96, Qiagen, n° de catálogo 74182), según los protocolos del fabricante. Posteriormente se preparó el ARN usando el kit de RNeasy (según las instrucciones del fabricante). El ARN se eluyó y se cuantificó con el kit de cuantificación de ARN RiboGreen® (Molecular probes, n° de catálogo R-11490). Se usó una cantidad igual de ARN total para el análisis mediante PCR en tiempo real para detectar la expresión del ARN de Id1 (instrumento ABI 7900). La PCR se realiza usando el kit Taqman One Step PCR Master Mix (ABI, n° de catálogo 4309169) de cebador de ID1/secuencias de sonda, enumeradas a continuación. La PCR se realizó usando 40 ciclos de las siguientes condiciones de apareamiento y amplificación: 35 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 min.

Sonda TaqMan:

5'-6-FAM conjugado con CPG, y 3'-TAMRA.

40 Nombre: ID1

Secuencia de las sonda: 5' CCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGA 3' (SEQ ID NO: 119)

Cebadores Taqman de PCR:

Nombre: ID1-F

Secuencia: 5' AAGGTGAGCAAGGTGGAGATTC 3' (SEQ ID NO: 120)

45 Nombre: ID1-R

Secuencia: 5' TTCCGAGTTCAGCTCCAAGT 3' (SEQ ID NO: 121)

Algunos ejemplos de las valoraciones del Id1 para la molécula principal 1.12.1 (M29I / D19A) (incluyendo variantes de la secuencia de 1.12.1) y el derivado de Fab se muestran en las Figuras 4 y 5.

En la Tabla 11A se muestra un resumen de los valores medios de la CI_{50} para este ensayo. Todas las determinaciones de la CI_{50} se realizaron por triplicado.

5 Ejemplo 13. Fosforilación del Smad1 detectada mediante el sistema de imágenes por infrarrojo Odyssey de LI-COR Biosciences (placa de 24 pocillos)

Se sembraron HUVECs (Biowhittaker, nº de catálogo CC-2519) en placas de 24 pocillos, a 18.000 células/pocillo en 600 ml de medio HUVEC completo (kit EGM-2 Bullet, Biowhittaker, nº de catálogo CC-3162), y se dejaron crecer durante una noche. Al día siguiente las células eran normalmente confluyentes al 50 %. El medio completo se retiró y se añadieron 200 ml de medio de inanición (medio de inanición: EBM-2 únicamente con un 0,2 % de FBS). Las células se incubaron durante 2 h. Después las células se trataron con 40 ml de solución de anticuerpo en PBS durante 3 horas. Finalmente, las células se trataron con 0,3 X de Medio Completo (concentración final) durante 35 minutos. El medio se retiró y las células se lisaron en 80 ml de 1,1 X de tampón de muestra (Invitrogen, nº de catálogo NP0007). El Smad1 fosforilado fue determinado mediante inmunotransferencia Western usando X Cell Surelock Mini-Cell & Blot Module (Invitrogen, nº de catálogo EI0002). El Smad1 fosforilado fue detectado usando un anticuerpo de conejo anti-fosfor-Smad1 (Cell Signaling, nº de catálogo 9511), que después es detectado mediante un conjugado IRDye™ 800 de IgG anti-conejo (Rockland Immuno-chemicals, nº de catálogo 611-732-127). La cantidad de Smad1 fosforilado se cuantificó usando el generador de imágenes por infrarrojo Odyssey (Li-Cor). Se usó actina (Santa Cruz, # sc-8432) para la normalización (anti-ratón Alex 680, Molecular Probe, nº de catálogo A-21058). En la Tabla 11 se muestra un resumen de los valores medios de la CI_{50} para este ensayo. Todas las determinaciones de la CI_{50} se realizaron por triplicado.

Tabla 11

Clon	ID1 mediante Taqman CI_{50} nM	pSmad1 mediante Western CI_{50} nM
1.11.1	nd	nd
1.12.1 (M29I / D19A)	16	18
1.13.1	100	87
1.27.1	82	70
1.29.1	94	82
1.31.1	24	21
1.162.1	75	15
1.183.1	58	17
4.24.1	100	82
4.38.1	87	52
4.58.1	14	15
4.62.1	24	34
4.68.1	141	110
4.72.1	21	35
5,13,1	30	68

Ejemplo 14. Características de internalización de los anticuerpos monoclonales anti-ALK-1

25 Se usó FACS para monitorizar la evolución con el tiempo del receptor de la ALK-1 remanente de la superficie celular, así como del anticuerpo neutralizante. La ALK-1 de la superficie celular es monitorizada por un anticuerpo marcador que es capaz de unirse a la ALK-1 de la superficie celular y reconocer a un epítipo diferente al del anticuerpo neutralizante. Se identificó un mAb de ratón anti-ECD de la ALK-1 humana (R&D systems, nº de catálogo AF310) y se usó en el estudio como anticuerpo marcador.

30 Se estudió la evolución temporal de la internalización usando líneas celulares endoteliales HUVEC y HUAEC. Las células se hicieron crecer a 37 °C con un 5 % de CO₂ en placas de 24 pocillos que contienen 200 ml de medio de cultivo completo por pocillo. En cada uno de los 11 puntos temporales durante el transcurso de 48 horas, se añadieron 2 ml de una solución de anticuerpo de 1 mg/ml a un pocillo y se mezclaron (la concentración final del anticuerpo neutralizante es de 10 mg/ml). Entonces la placa se devolvió la estufa de incubación a 37 °C hasta el punto temporal de la hora 0, cuando la placa se colocó en hielo para detener el proceso de internalización. En este punto se añadió el anticuerpo marcador a los pocillos (concentración final de 10 mg/ml) y se incubaron en hielo durante 1 h. Después las células se lavaron con PBS, se desprendieron mediante tripsinización y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Después las células se lavaron, se bloquearon y se trataron con anticuerpos secundarios portadores de diferentes fluoróforos con objeto de monitorizar tanto el anticuerpo neutralizante como del receptor de la ALK-1 remanente en la superficie celular. Las muestras se ensayaron en un instrumento de citometría de flujo FACSCalibur, contando 3.000 - 5.000 eventos/muestra. Se calculó la media geométrica de cada muestra en el canal de fluorescencia específico y se representó en función del tiempo. Los datos se ajustaron a una ecuación modificada

de desintegración radioactiva para obtener la semivida ($t_{1/2}$) de internalización, así como el porcentaje de anticuerpo neutralizante o del receptor de la ALK-1 remanente en la superficie celular cuando la internalización alcanzaba el estado estacionario. Según se muestra en la Figura 6, el mAb 1.12.1 (M291 / D19A) se internaliza a la misma velocidad y en el mismo grado que el receptor de la superficie celular de la ALK-1. La semivida de internalización del 1.12.1 (M291 / D19A) es de ~2 h. Se alcanzó el equilibrio cuando se internalizó un 50 % el anticuerpo. Un anticuerpo policlonal adquirido en R&D systems (nº de catálogo AF370) se internaliza a una $t_{1/2}$ de 1 h y alcanza el estado estacionario estando un ~70 % del receptor internalizado (Figura 6). Se observaron unas características de internalización similares con otros mAbs anti-ALK-1 humanos de la invención (no mostrado).

Ejemplo 15. Establecimiento de ratones quiméricos de prepucio humano - SCID

Se realizó una modificación significativa del procedimiento quirúrgico a un procedimiento publicado previamente H-C Yan, y col., "Human/Severe Combined Immunodeficient Mouse Chimeras, An Experimental In Vivo Model System to Study the Regulation of Human Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecules", J. Clin. Invest 91: 986, 1993; J. Vamer "Regulation of Angiogenesis In Vivo by Ligation of Integrin $\alpha 5\beta 1$ with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin" Amer. J. Path.156 (4): 1345, 2000; K. Tahtis, y col., "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mol. Cancer. Ther. 2 (8): 729, 2003. Tras su llegada del National Disease Research Institute y Cooperative Human Tissue Network, se recortaron trozos de prepucio humano de regiones enfermizas y se transfirieron a medio RPMI (Celigo/Mediatech, nº de catálogo MT-15-040-CV complementado con Penicilina y Estreptomicina (Gibco/Life Tech, nº de catálogo 15070-063) (añadir 5 ml de solución madre de pen/estrep en 500 ml de RPMI). Usando un bisturí y cortando en placas de Petri estériles, se recortaron las pieles con una forma ovalada de aproximadamente 8 x 13 mm limpiando los bordes rasgados y los tejidos conectivos, y se almacenaron en hielo húmedo antes de la cirugía. Se inyectó intraperitonealmente el volumen apropiado (4 ml/gramo de animal) de una solución de 100 mg/ml de ketamina (Ketaset^{TR}, Fort Dodge Animal Health)/1 mg/ml de medetomidina (Pfizer Animal Health - Dormitor) en el abdomen de ratones scid (es decir, a un ángulo de 45°, bajo la piel pero no demasiado profundamente internamente). Una vez anestesiados, a los ratones se les aplicó lubricante ocular, una inyección subcutánea de ketoprofeno (10 mg/kg, Fort Dodge Animal Health) y se agitó el pelo en el sitio de la cirugía. La región quirúrgica se lavó quirúrgicamente tres veces usando Clorahexiderm (Butler, Chclo-Scrub 40, nº de catálogo WAB20109) y después con alcohol en un movimiento circular que comenzó desde el centro del sitio quirúrgico hacia fuera evitando ir desde un área sucia hacia un área limpia. Los ratones se transfirieron a la campana quirúrgica preparada y se colocaron sobre una almohadilla de agua caliente (Gaymar Industries, nº de catálogo TP500 T/Pump) que se mantuvo a 37 °C. Entonces los ratones se pusieron bajo anestesia con isofluorin durante la duración de la cirugía. El lado dorsal de un ratón se cubrió con un apósito quirúrgico para exponer el sitio quirúrgico. La piel del ratón se cogió con pinzas y se cortó tejido cutáneo con forma ovalada con unas tijeras curvadas en un solo movimiento. Se puso prepucio humano del tamaño apropiado en el ratón. La piel humana y del ratón se superaron entre sí usando sutura Ethilon (Ethicon nº de catálogo 697H.), partiendo de la parte superior del óvalo, después hacia abajo, después tal extremo derecho y después al extremo izquierdo. Se crearon más suturas entre ellos para asegurar los tejidos entre sí. Se crearon aproximadamente 8 suturas equidistantes alrededor de la piel. Durante la cirugía, se usó una jeringa con suero salino estéril para irrigar la herida quirúrgica de piel/ratón cuando se secó. Se puso Bandaid sobre la herida. Después se usó un apósito transparente (3M TegadermTM) para envolver holgadamente la venda. El apósito se cortó al tamaño adecuado para cubrir un área ligeramente más amplia que el Bandaid. Entonces al ratón se le administró Atipamezol (50 - 100 ml, Pfizer Animal Health - Antisedan) y el ratón se recuperó en una jaula caliente en 5 - 10 min. El apósito y las vendas se retiraron en 7 - 10 días y alrededor del día 15 la mayoría de las pieles aparecían con costra. La curación completa se produjo entre los 21 - 28 días, tiempo tras el cual estaban listas para ser inoculadas con las células tumorales. En la Figura 8 se muestra un ejemplo del análisis histológico (tinción de H & E) de una sección de la piel infectada tras la cirugía. La histología de la piel injertada simula estrechamente las características de la piel humana implantada en los ratones descrita por Tahtis, y col., "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mol. Cancer. Ther. 2 (8): 729, 2003, h. e.: capa epidérmica humana; h. d.: capa dérmica humana.

Ejemplo 16. Modelo de colágeno en ratones quiméricos de prepucio humano - SCID

Se diluyó una solución madre de colágeno I (nº de catálogo 354236, Becten-Dickinson) de 4 mg/ml con ácido acético 0,02 N y se mantuvo en hielo antes de su implantación. La solución de colágeno ácido (8 partes) se mezcló con 10 X M199 (Sigma, nº de catálogo M9163) (1 parte) y se añadió fibronectina de plasma humano (Fn) (nº de catálogo 354008, Becten-Dickinson) hasta alcanzar una concentración final de Fn de 90 ml/ml; se añadió NaOH (1,0 N) para ajustar el pH a - 7,2. La mezcla de colágeno/Fn se mantuvo en hielo hasta su uso. La mezcla de implante se preparó usando la anterior mezcla de colágeno/Fn más un inhibidor angiogénico de interés con o sin células endoteliales macro vasculares humanas (HMVEC), (Cascade Biologics, nº de catálogo C-010-5C). Las HMVECs se prepararon como 6×10^6 células/ml en PBS. Se inyectaron intradérmicamente 50 - 100 ml de la mezcla de implante en el prepucio de los ratones scid quiméricos. 7 - 14 días después se recogieron los tapones de colágeno, se incluyeron en el compuesto OCT (nº de catálogo 4583, Sajura Finetek, CA) y se congelaron instantáneamente para un análisis mediante inmunohistoquímico. El tapón de colágeno del prepucio se identificó con el kit Trichrome (nº de catálogo KC1641, Mater Tech, CA) como una tinción azul, según se muestra en la Figura 9 (A). Los vasos humanos se identificaron mediante tinción para P-CAM humano usando el anticuerpo anti-CD-31 humano (Clon 13.3, Vector Laboratories) (Figura 9 (B)). La Tabla 12 resume la tinción de los vasos humanos y la cuantificación en el modelo de

colágeno en los ratones quiméricos de prepucio - SCID.

Tabla 12. Resumen de los resultados del modelo de colágeno

Matriz	HMVEC en la Matriz	Tratamiento (Rx)	Días de Rx	Criterio de valoración del estudio	Puntuación de los vasos humanos (1×10^3)	% de Control (vasos humanos)
1,6 mg/ml de colágeno	Ninguna	Sin tratamiento	4	Tinción del CD-31 humano	$0,036 \pm 0,001$	40
1,6 mg/ml de colágeno	7×10^3	Sin tratamiento	4		$0,071 \pm 0,022$	78
1,6 mg/ml de colágeno	$1,4 \times 10^4$	Sin tratamiento	4		$0,063 \pm 0,016$	69
2,4 mg/ml de colágeno	Ninguna	Sin tratamiento	4		$0,091 \pm 0,056$	100
2,4 mg/ml de colágeno	7×10^3	Sin tratamiento	4		$0,067 \pm 0,049$	74
2,4 mg/ml de colágeno	$1,4 \times 10^4$	Sin tratamiento	4		$0,062 \pm 0,047$	68
3,0 mg/ml de colágeno	$8,8 \times 10^3$	Sin tratamiento	4	Tinción del CD-31 humano	54 ± 9	100
3,0 mg/ml de colágeno	$8,8 \times 10^3$	Anticuerpo de control de isotipo 100 mg/ml mezclado en gel	4		52 ± 13	96
3,0 mg/ml de colágeno	$8,8 \times 10^3$	100 mg/ml de anticuerpo 1.12.1 (M29I / D19A) mezclado en gel	4		15 ± 3	28
3,0 mg/ml de colágeno	Ninguna	Sin tratamiento	4	Tinción del CD-31 humano	$0,112 \pm 0,026$	100
5,0 mg/ml de colágeno	Ninguna	Sin tratamiento	4		$0,031 \pm 0,012$	28
3,0 mg/ml de colágeno	Ninguna	Anticuerpo de control de isotipo 100 mg/ml. Inyección i. d.	4	Tinción del CD-31 humano	75 ± 15	100
3,0 mg/ml de colágeno	Ninguna	100 mg/ml de anticuerpo 1.12.1 (M29I / D19A). Inyección i. d.	4		39 ± 11	52
3,0 mg/ml de colágeno	Ninguna	100 mg/ml de anticuerpo 1.14.1. Inyección i. d.	4		44 ± 28	59

Ejemplo 17. Modelo tumoral M24met en ratones quiméricos de prepucio humano - SCID

- 5 En estos estudios se usaron normalmente injertos con una edad de entre 5 - 10 semanas tras la cirugía. La línea celular M24met fue descrita por Mueller y sus colaboradores en "Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells", Cancer Research, 55 (8): 1629 - 32, 1995. La suspensión de células M24met se preparó como sigue: se lavaron células M24met concluyentes al 80 %, se tripsinizaron usando Tripsina/EDTA (Gibco, nº de catálogo 25200-056) y se recogieron en el medio PRMI
- 10 (Cellgro/Mediatech, nº de catálogo MT-15-040-CV) complementado con un 10 % de FBS (Cellgro/Mediatech, nº de catálogo AKD-11775) y L-glutamina 2 mM (Cellgro/Mediatech, nº de catálogo 25-005-CI). Las células se centrifugaron a 600 rpm durante 5 min, se resuspendieron en PBS el estéril. Los recuentos celulares se estimaron usando un contador Cell Coulter (Beckman Coulter, Modelo Z2). Las células se centrifugaron a 600 rpm durante 5 min y se resuspendieron en una mezcla de colágeno y Fn (3 mg/ml) para obtener una suspensión de células de 4×10^7 células/ml para su implantación.
- 15

Para inocular se inyectaron 2×10^6 de las células anteriores (50 µl de 4×10^7 células/ml) intradérmicamente en la piel humana injertada en el ratón. En el día 5 - 7 después del implante, los tumores eran palpables y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de Control y de Tratamiento antes de comenzar la dosificación. El grupo de Control se define como aquel en el que los animales no recibían ninguna dosis, una dosis del Vehículo en el que se

20 había constituido el anticuerpo anti-ALK-1 o una dosis del anticuerpo monoclonal humano anti-KLH coincidente con el isotipo de la IgG₂ (Pfizer Inc). El grupo de Tratamiento se define como aquel en el que los animales recibirían una dosis del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A).

Ejemplo 18. Tinción doble por inmunofluorescencia (IF) del CD-31 humano y de ratón

Las secciones tisulares congeladas se secaron al aire y se fijaron a -20 °C en acetona (Fisher, nº de catálogo A16S-4), o 10 min. Las muestras se secaron de nuevo al aire y se lavaron tres veces con PBS durante 5 min cada vez. Las muestras se bloquearon con suero de conejo al 5 % (Vector Laboratories, nº de catálogo S-5000) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de anticuerpos primarios se preparó en suero de conejo al 5 % en anticuerpo anti-CD-31 humano (Santa Cruz, nº de catálogo SC1505) y anti-CD-31 de ratón (Pharmin-gen, Clone Mec1 3.3, nº de catálogo 01951A) a unas diluciones de 1: 100 y 1: 150, respectivamente. La anterior mezcla de anticuerpos se añadió a las muestras tisulares durante 1 hora a TA. Los bloques se lavaron tres veces con PBS durante 5 min cada vez antes de ser incubados con la mezcla de anticuerpos secundarios durante 1 hora a TA. La mezcla de anticuerpos secundarios se preparó en PBS/0,05 % de Tween-20 (Sigma, nº de catálogo P1379), anticuerpo de ratón anti-cabra Texas Red (Jackson Labs, nº de catálogo 305-075-003) y anticuerpo de conejo para FITC anti-rata (Jackson Labs, nº de catálogo 312-095-003). Los anticuerpos se diluyeron a 1:50 si se usaban anticuerpos congelados, o a 1:100 si se usaban anticuerpos frescos. Los portaobjetos se lavaron de nuevo tres veces con PBS durante 5 min cada vez antes de montarlos en Vectashield (Hard Set, medio de montaje con DAPI, Vector Lab, CA, nº de catálogo H-1500). Los portaobjetos se mantuvieron en la oscuridad y a 4 °C hasta su análisis por imagen. El análisis por imagen se realizó usando un microscopio fluorescente Olympus BX60 y se tomaron fotografías usando una cámara digital en color Olympus microfire. Se tomaron fotografías de 3 - 5 puntos calientes/porta, un porta/animal, 4 - 7 animales/grupo, y las áreas de los vasos, indicadas por la tinción positiva del anti-CD-31 humano, se cuantificaron para tres individuos usando Image Pro Plus v4.5 (MediaCybernetics). El criterio de valoración farmacodinámico (media del grupo) se expresó como el porcentaje de inhibición del CD-31 humano en comparación con el grupo de Control o como el área total de vasos humanos. La significación estadística se determinó mediante ANOVA. En la Figura 10 se muestran una imagen inmunofluorescente de vasos humanos (rojos) y de ratón (verdes) del tumor M24met en los ratones quiméricos de prepucio humano SCID.

Ejemplo 19. Tinción inmunohistoquímica (IHC) del CD-31 humano

Las secciones tisulares congeladas se secaron al aire y se fijaron a -20 °C en acetona durante 10 min. Las muestras se secaron de nuevo al aire y se lavaron tres veces con PBS durante 5 min cada vez. Las muestras se incubaron en 0,075 % de H₂O₂/ metanol (Fisher nº de catálogo A433-4) durante 15 min y se lavaron tres veces con PBS durante 5 min cada vez. Las muestras se bloquearon con suero de conejo al 5 %/PBS durante 30 min y se les aplicó anticuerpo anti-CD-31 humano 1:100 (Santa Cruz, nº de catálogo SC1505) en suero de conejo al 5 % durante 1 hora a TA. Las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 5 min cada vez y se les aplicó anti-cabra de conejo a 1:200 (Vector Labs, nº de catálogo BA-5000) en suero de conejo al 5 % durante 35 min a TA. Después las puertas se lavaron dos veces con PBS durante 5 min cada vez y se añadió estreptavidina recién preparada (Vector Labs, ABC Elite kit, nº de catálogo PK-6100). Los portaobjetos se lavaron de nuevo dos veces con PBS durante 5 min cada vez y después se revelaron con diaminobencidina (DAB) (Vector Labs, nº de catálogo SK-4100). Los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS durante 5 min cada vez seguido de hematoxilina Mayers (Sigma, nº de catálogo HHS-32) durante 5 segundos. Después las muestras se lavaron bien con diH₂O y se sumergieron brevemente dos veces en la solución diluida de hidróxido amónico (5 ml de solución madre en 1 l de diH₂O) (Sigma, nº de catálogo A-6899) y se lavaron de nuevo con diH₂O. Después las muestras se deshidrataron en alcohol al 70 %, 90 % y después al 100 % (Harleco, nº de catálogo 65347/85) 1 minuto cada vez y finalmente con xileno (JT Baker, nº de catálogo 516,09). Los portaobjetos se montaron con Cytoseal 60 (Stephens Scientific, nº de catálogo 8310-4,) y se cubrieron con cubreobjetos para el análisis por imagen. En la Figura 11 se muestra la imagen de IHC de vasos humanos (marrón) de tumor M24met en los ratones quiméricos de prepucio humano-SCID.

Ejemplo 20. Tratamiento terapéutico con el anticuerpo 1.12.1 (M29I / D19A) anti-ALK-1

Para el tratamiento, la dosificación se realizó bien subcutáneamente (sc) o bien intravenosamente (iv). Normalmente se administró una dosis del anticuerpo 1.12.1 (M29I / D19A) para cada estudio. La segunda dosis del anticuerpo ALK-1, si fuera necesaria, se administró el día 9 o 10. Algunas veces se administraron niveles de dosis múltiples, es decir, de 1, 5, 10, 50 mg/kg, para investigar la inhibición dependiente de la dosis de crecimiento de vasos humanos. Los animales fueron monitorizados diariamente y los tumores se midieron tres veces/semana mediante calibres. Alrededor del día 14 -17 los tumores median entre 250 - 350 mm³ y se extirparon de los ratones, se incluyeron en OCT y se congelaron para un análisis mediante IF o IHC. En la Figura 12 se muestran unas representativas imágenes inmunofluorescentes de vasos humanos (rojos) y de ratón (verdes) de los tumores M24met de Control y Tratados con 1.12.1 (M29I / D19A) (10 mg/kg) en los ratones quiméricos de prepucio humano-SCID. La inhibición dependiente de la dosis de los vasos tumorales humanos por parte del 1.12.1 (M29I / D19A) en el modelo de ratón quimérico de prepucio humano-SCID se muestra en la Figura 13, y en la Tabla 13 se presenta un resumen de los estudios relacionados.

Tabla 13

<u>Resumen del modelo de caracterización <i>in vivo</i> y de la inhibición del crecimiento de vasos humanos de los tumores M24met en el modelo de SCID-quimera</u>							
Parámetros del protocolo					Criterios de valoración		Notas generales
Tumor	Fármaco	Dosis	Vía	Cronograma	CD31 (% de inhibición en comparación con el Control)	Día del estudio	
MCF-7	Ninguno	Na	na	na	no cuantificada	19	Tumores implantados intradermicamente. Ensayados con y sin implante de estradiol y de colágeno. Los tumores crecieron lentamente y expresaron poco CD31 humano
M24met	Ninguno	Na	na	na	no cuantificada	19	Tumores implantados intradermicamente. Ensayados con y sin matriz de colágeno/FN. Con la matriz se encontró un crecimiento tumoral superior, todos los estudios futuros contendrán complementos de matriz. Es tumores mostraron una buena tinción del CD31 humano
M24met (small)	Ninguno	Na	na	na	no cuantificada	9	Tamaño del tumor < 100 mm ³ Poco CD31 humano
M24met (medium)	Ninguno	Na	na	na	no cuantificada	12	Tamaño del tumor < 100 - 200 mm ³ Algún CD31 humano

(continuación)

<u>Resumen del modelo de caracterización <i>in vivo</i> y de la inhibición del crecimiento de vasos humanos de los tumores M24met en el modelo de SCID-quimera</u>							
Parámetros del protocolo					Criterios de valoración		Notas generales
Tumor	Fármaco	Dosis	Vía	Cronograma	CD31 (% de inhibición en comparación con el Control)	Día del estudio	
M24met (large)	Ninguno	Na	na	na	no cuantificada	12	Tamaño del tumor < 200 mm ³ Los tumores M24met tienen un número superior de tinción de vasos humanos, los futuros estudios se realizan con tumores más grandes
M24met	IgG humana no específica	10 mg/kg	IV	2 dosis (días 5 & 9)	0	15	Primer estudio de cribado. El 1.12.1 (M29I / D19A) mostró una reducción significativa en la tinción del CD31 humano. No se observó inhibición del crecimiento tumoral
	1.12.1 (M29I / D19A)	10 mg/kg	IV		42		
M24met	IgG humana no específica	10 mg/kg	IV	2 dosis (días 5 & 10)	0	14	Segundo estudio de cribado. Se confirmaron los resultados de GW-366. No se observó inhibición del crecimiento tumoral
	1.12.1 (M29I / D19A)	10 mg/kg	IV		40		
M24met	IgG humana no específica	10 mg/kg	SC	2 dosis (días 5 & 10)	0	14	Primer ensayo de la actividad dependiente de la dosis del 1.12.1 (M29I / D19A) frente al CD31 humano. Se observaron algunos efectos dependientes de la dosis. La PK indica que una única dosis será suficiente
	1.12.1 (M29I / D19A)	10 mg/kg	SC		43		
	1.12.1 (M29I / D19A)	1 mg/kg	SC		50		Para una reducción significativa en CD31. No se observó inhibición del crecimiento tumoral
	1.12.1 (M29I / D19A)	0,1 mg/kg	SC		20		

(continuación)

M24met	Ninguna dosis	0 mg/kg	na	na	ND	16	Segundo ensayo de la actividad dependiente de la dosis del 1.12.1 (M29I/D19A) frente al CD31 humano. Se observó un claro efecto anti-CD31 dependiente de la dosis. No se observó inhibición del crecimiento tumoral
	El isotipo se correspondía con la IgG	10 mg/kg	SC		0		
	IgG humana no específica	10 mg/kg	SC		ND		
	1.12.1 (M29I / D19A)	1 mg/kg	SC	una dosis (día 5)	24		
	1.12.1 (M29I / D19A)	5 mg/kg	SC		59		
	1.12.1 (M29I / D19A)	10 mg/kg	SC		72		
M24met	El isotipo se correspondía con la IgG	10 mg/kg	SC		0	14	Ensayo final de amplio intervalo de dosificación para el 1.12.1 (M29I / D19A). El estudio mostró unos buenos efectos dependientes de las dosis. El ajuste de los datos una curva de dosis respuesta sigmoidea produce una CI ₅₀ de 93 nM. No se observó inhibición del crecimiento tumoral
	1.12.1 (M29I / D19A)	1 mg/kg	SC		33		
	1.12.1 (M29I / D19A)	3 mg/kg	SC		41		
	1.12.1 (M29I / D19A)	5 mg/kg	SC	una dosis (día 5)	60		
	1.12.1 (M29I / D19A)	7,5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1 (M29I / D19A)	10 mg/kg	SC		73		
	1.12.1 (M29I / D19A)	50 mg/kg	SC		70		

Ejemplo 21. Determinación de la CE₅₀ *in vivo*

5 A los ratones quiméricos de prepucio humano SCID se les implantaron intradérmicamente células M24met y se trataron (sc) con anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A) a 1, 3, 5, 7,5, 10 y 50 mg/kg o con anticuerpo de coincidente con el anti-KLH humano (10 mg/kg). Una vez concluido el experimento, se cuantificó el área de vasos humanos en cada tumor, según se describió anteriormente. Se midieron las concentraciones plasmáticas en los ratones del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A) usando el procedimiento descrito como sigue: se analizaron muestras séricas procedentes de los ratones para comprobar la concentración del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A) mediante un ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción). Las placas de ELISA se recurrieron con 10 µg/ml de anticuerpo específico Fc de cabra anti-IgG humana (Pierce, nº de catálogo 31123) en PBS, se incubaron durante una noche a 4 °C y después se bloquearon con tampón de bloqueo StartBlock (Pierce, nº de catálogo 37542) a temperatura ambiente durante 1 h. Las muestras séricas se diluyeron antes del análisis a 100 y 1.000 veces en tampón de bloqueo StartBlock. Se prepararon dos conjuntos de estándares en el suero en blanco diluido a 100 y 100 veces. Los estándares y las muestras séricas diluidas se incubaron en la placa durante 1 h. El anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A) unido se detectó usando anticuerpo anti-IgG humana de cabra (específico de Fab) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, nº de catálogo A0293). El sustrato usado era 3, 3', 5, 5'-

tetrametil bencidina (Sigma, nº de catálogo T8665). La absorbancia se leyó a 450 nm con un lector de placas Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Se ajustó una curva estándar usando una regresión no lineal. El límite de detección de este ensayo era de 10 ng/ml de anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A).

5 La concentración plasmática en los ratones SCID del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I / D19A) se muestra en la Figura 15.

10 La Figura 15 representa la CE_{50} estimada para el 1.12.1 (M29I / D19A) en el modelo de quimera de M24met de prepucio SCID. El área de los vasos humanos se representó frente a la PK plasmática media a lo largo del periodo de estudio (14 días) para cada grupo de tratamiento. Se produjo una curva de ajuste mediante el programa Sigmoidal Dose Dependent en el Graphpad (Prizm). La CE_{50} de 93 ng/ml (la CE_{50} se define como la concentración plasmática requerida para una reducción del 50 % del área de vasos humanos en el grupo de Control) se derivó a partir del ajuste de la curva.

Se desvelan a continuación cláusulas preferidas de la presente divulgación y se designan R1 a R24.

E1. Un anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno que se une con ALK-1 que comprende un primer dominio variable que comprende SEQ ID NO: 6 y segundo un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 8.

15 E2. El anticuerpo monoclonal de R1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

E3. El anticuerpo monoclonal de R1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 100 y que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 102.

20 E4. El anticuerpo monoclonal de R1 que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 8.

E5. El anticuerpo monoclonal de R1 o 4, seleccionándose el anticuerpo monoclonal de IgG1 o IgG2.

E6. Un anticuerpo monoclonal humano o parte de unión a antígeno del mismo que se une con ALK-1 y que tiene al menos una propiedad adicional seleccionada del grupo que consiste en:

25 a) se une con el dominio extracelular de ALK-1 de primate con un valor de avidéz de 5 nM o menos como se mide por resonancia de plasmón superficial;

b) se une con el dominio extracelular de ALK-1 humano con un valor de avidéz de 250 pM o menos como se mide por resonancia de plasmón superficial;

30 c) tiene una velocidad de disociación (k_{off}) para ALK-1 humana de $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menor como se mide por resonancia de plasmón superficial;

d) se une con ALK-1 de primate con una K_D de 50 nM o menos, como se mide por citometría de flujo;

e) tiene una $K_D(\text{roedor})/K_D(\text{primate})$ que es mayor de 1,5;

35 f) tiene una CI_{50} de 150 nM o menos como se mide por inhibición de la regulación positiva de un gen diana corriente abajo específico de ALK-1, Id1;

g) tiene una CI_{50} de 150 nM o menos como se mide por inhibición de la fosforilación de Smad1 determinada por Transferencia de Western;

40 h) inhibe la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID al que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que se implantan por vía intradérmica células tumorales M24met de melanoma humano como se determina por análisis de IHC de ensayo de señal de CD-31 humano en al menos 40 % en comparación con una muestra de control;

i) inhibe la angiogénesis vascular humana en un ratón SCID en el que se ha injertado tejido de prepucio humano, en el que se implanta por vía intradérmica colágeno como se determina por análisis de IHC de ensayo de señal de CD-31 humano en al menos 50 % en comparación con una muestra de control;

45 j) compite por la unión con ALK-1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; y 5.59.1;

50 k) compite de forma cruzada por la unión con ALK-1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1;

l) se une con el mismo epítipo de ALK-1 que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1;

55 m) se une con ALK-1 sustancialmente con la misma K_D que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1; y

n) se une con ALK-1 sustancialmente con la misma k_{off} que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

5 E 7. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 6, que comprende un dominio V_H que es al menos 90 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104.

E 8. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 6, que comprende un dominio V_L que es al menos 90 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127.

E 9. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 6, en el que el dominio V_H se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida, y el dominio V_L se selecciona independientemente de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida.

E 10. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 6, en el que dicho anticuerpo o parte se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo o parte que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 V_H seleccionadas independientemente de las secuencias de CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada, respectivamente, halladas en cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida; y

(b) un anticuerpo o parte que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 V_L seleccionadas independientemente de las secuencias de CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena ligera, respectivamente, halladas en cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida.

E 11. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con R 10, en el que el anticuerpo o parte se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo o parte que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 V_H halladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida; y

(b) un anticuerpo o parte que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 V_L halladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127, o una secuencia que difiere de una cualquiera de SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; o 127 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida.

E 12. El anticuerpo o parte de acuerdo con R 10 u 11 seleccionado del grupo que consiste en:

a) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 6, o difiere de SEQ ID NO: 6 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 8, o difiere de SEQ ID NO: 8 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida;

x) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 6, o difiere de SEQ ID NO: 6 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 127, o difiere de SEQ ID NO: 127 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida; y
 y) un anticuerpo o parte del mismo que comprende un dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 104, o difiere de SEQ ID NO: 104 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 8, o difiere de SEQ ID NO: 8 en al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida.

E 13. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 5, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno comprende una cadena pesada que utiliza un gen de V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59 humano, o en el que se produce al menos una sustitución de aminoácido conservativa en el gen V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59 humano, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida.

E 14. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 6, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno comprende una cadena ligera que utiliza un gen de V_K A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 o V_K L2 humano, o en el que se produce al menos una sustitución de aminoácido conservativa en el gen de V_K A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 o V_K L2 humano, en el que dicha secuencia con la al menos una sustitución de aminoácido conservativa es al menos 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia no sustituida.

E15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de R 6-14 que es una molécula de IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD, o deriva de la misma.

E 16. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 6, 7, 95, 101, 103, 126, 128 o 129.

E 17. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89 o 91.

E 18. Un hibridoma depositado con un número de referencia de ATCC de PTA-6808.

E 19. El anticuerpo producido por el hibridoma de R 18, o una parte de unión a antígeno del mismo.

E 20. Un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une con ALK-1, comprendiendo el anticuerpo o parte de unión a antígeno una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 2;
- b) SEQ ID NO: 4;
- c) SEQ ID NO: 6;
- d) SEQ ID NO: 8;
- e) SEQ ID NO: 100;
- f) SEQ ID NO: 102;
- g) SEQ ID NO: 104;
- h) SEQ ID NO: 127;
- i) la secuencia de aminoácidos del V_H codificada por la secuencia de nucleótidos del inserto hallado en el clon depositado con el número de referencia de ATCC PTA-6864; y
- j) la secuencia de aminoácidos del V_L codificada por la secuencia de nucleótidos del inserto hallado en el clon depositado con el número de referencia de ATCC PTA-6865.

E 21. El anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con R 20 que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 102;
- b) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 100 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 4; y
- c) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 100 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 102.

E 22. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de

acuerdo con cualquiera de R 1-15 o 19-21 y un vehículo fisiológicamente aceptable.

E 23. Un método para inhibir la angiogénesis en un mamífero que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de R 1-15 o 19-21 o la composición farmacéutica de acuerdo con R 22.

5 E 24. Un anticuerpo monoclonal humano o una parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente con ALK-1 en el que dicho anticuerpo o parte comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 136 en la que la G en la posición 1 se reemplaza con una D y la S en la posición 5 se reemplaza con una N; y

10 (b) una secuencia de aminoácidos de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 136 en la que la G en la posición 1 se reemplaza con una E y la S en la posición 5 se reemplaza con una N.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Amgen Fremont Inc.
Pfizer Inc.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS PARA QUINASA-1 DE TIPO RECEPTOR DE ACTIVINA

20 <130> P31976EP-D2-PCT

<140> Aún no asignada
<141> 06-09-2006

25 <150> US 60/715.292
<151> 07-09-2005

<150> EP12152953.1
<151> 06-09-2006

30 <160> 136

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1
<211> 1332
<212> ADN
<213> Humano

40 <400> 1

ES 2 681 656 T3

```

caggtgcagc tgcaggagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtaat actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagtacctac      180
tacaaccogt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgag gacacggcag tgtattactg tgcgagagag      300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc      360
accaagggcc catcggtctt cccctggcag cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca      420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac      480
tcaggcgcctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tctacagtc ctcaggactc      540
tactccctca gcagcgtagt gaccgtgcc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc      600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtgaca agacagttga gcgcaaatgt      660
tgtgtcgagt gccaccctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc      720
ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctagggtcac gtgcgtggtg      780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag      840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gaggcagttca acagcacggt cctgtgtggtc      900
agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtataa gtgcaaggtc      960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaacca agggcagccc     1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc     1080
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggactc cgacggctcc     1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg     1320
tctccgggta aa                                                                1332

```

5 <210> 2
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 2

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

ES 2 681 656 T3

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

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

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

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

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

ES 2 681 656 T3

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

5 <210> 3
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctogccgat caccttggc 300
 caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtott catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggctctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

10
 15 <210> 4
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 4

ES 2 681 656 T3

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

<210> 5
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 5

ES 2 681 656 T3

caggtgcagc tgcaggagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc 120
 cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagtacctac 180
 tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccttgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

5 <210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 6

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

10 <210> 7
 <211> 325
 <212> ADN
 15 <213> Humano
 <400> 7

ES 2 681 656 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgta gggccagtc gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgcgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

5 <210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 8

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

10 <210> 9
 <211> 361
 <212> ADN
 15 <213> Humano
 <400> 9

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agtcatggca tgtactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300
 gagcagtggc ccgatgtttt tgatatctgg ggccaagggg caatgggtcac cgtctcttca 360
 g 361

20

ES 2 681 656 T3

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Humana

5

<400> 10

```

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Asp Gln Glu Gln Trp Pro Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100          105          110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115          120
    
```

10 <210> 11
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Humano

15 <400> 11

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca gggcattaga aattatntag cctgggtttca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagtccct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                             322
    
```

20 <210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humana

ES 2 681 656 T3

<400> 12

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- 5 <210> 13
- <211> 355
- <212> ADN
- <213> Humano

10 <400> 13

caggtgcacc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgg 120
 cagccccccg ggaagggact ggagtggatt gggatatatct attacagtgg gagcaccaac 180
 tacaaccctt cctcaagag tcgaatcacc atatcaatag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccttgaagc tgaactctgt gaccgctgcg gacacggcct tgtattactg tgcgagagaa 300
 tcagtggccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

- 15 <210> 14
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Humana

20 <400> 14

ES 2 681 656 T3

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

115

<210> 15
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 15

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agtaggtact tagcctggta ccagcaggaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcaa cactatggta gctcacogat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

10

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 16

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 17
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 17

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgg 120
 cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggatatct attacagtgg gagcaccaac 180
 tacaaccct ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtcaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 gcagtgccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

10
 15 <210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 18

ES 2 681 656 T3

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

5 <210> 19
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 19

	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agtacctact tagcctggca ccagcagaaa	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgtatcca gcagggccag tggcgtccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgat caccttgggc	300
10	caagggacac gactggagat taaac	325

15 <210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 20

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 21
 <211> 370
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 21

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtc actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccttgaagc tgagttctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgagagcg 300
 gggcgatddd tggagtggtc tgatgtddd gatattctggg gcccaaggac aatgggtcacc 360
 gtctcctcag 370

10
 15 <210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 22

ES 2 681 656 T3

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

5 <210> 23
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 23

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatgatact 300
 10 cctccgacgt tcggccaagg gaccaagtg gaaatcaaac 340

15 <210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 24

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Tyr Tyr Asp Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

5 <210> 25
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 25

5 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc 60
 atctgtactg tttctggtgg ctccatcagc agtgggtgaat actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctg ccctcaagag tgcacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 10 gggatcgggtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcag 355

15 <210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 26

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Ile Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 27

gaaattgtgt tgacgcagtc gccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctctaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaetc tcaccatcat cagactggac 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cggtatggta gctcaccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

10

<210> 28
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 28

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 29
 <211> 361
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 29

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agaggacgat 300
 agcagtggtt gccctactt tgactactgg ggcagggaa cctggtcac cgcttccctca 360

g 361

10

<210> 30
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 30

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Asp Asp Ser Ser Gly Cys Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Ala Ser Ser
 115 120

5 <210> 31
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 31

gaaatagtga tgacgcagtc tocagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccagggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagtc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccattcac tttcggcct 300
 10 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

15 <210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 32

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 33
 <211> 370
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 33

cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgcagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtc actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccctc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcgcctac 180
 tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagcg 300
 gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatatctggg gcccaagggac aatggtcacc 360
 gtctctttag 370

10

<210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 34

ES 2 681 656 T3

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

5 <210> 35
<211> 340
<212> ADN
<213> Humano

<400> 35

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact 120
tggtaccagc agaaaccagg acggcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaata ttataatact 300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaagc 340

10
15 <210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> Humana

<400> 36

ES 2 681 656 T3

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

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

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

Tyr Tyr Asn Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

```

Lys

5 <210> 37
 <211> 379
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 37

```

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggggc cctgagactc      60
tctgtgagc cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtgtaatac catatactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tocagggaca acgccaggaa ctactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggaagcc      300
tatgatagta gtggttacta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc      360
acggtcaccg tctcctcag                                     379

```

10
 15 <210> 38
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 38

ES 2 681 656 T3

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

5 <210> 39
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 39

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtctagtca gaggctcctg catagtgatg gaaagaccta cttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
 tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcagga cagatttcac actgacaatc 240
 agccgggtgg aggctgacga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtac acaccttctc 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtgaa atcaaac 337

10 <210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Humana

<400> 40

ES 2 681 656 T3

```

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

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

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

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

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

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

```

<210> 41
 <211> 376
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 41

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt cggccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaagtgatgg tgggacaaca      180

gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacagc      240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca      300
gggaattact atgatgtag tggttattac tcttttgact actggggcca gggaaccctg      360
gtcaccgtct cctcag                                     376

```

10

<210> 42
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 42

ES 2 681 656 T3

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

<210> 43
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 43

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaga gccggcctcc 60
 atctctctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaac 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
 cccactttcg gcggagggaac caaggtggag atcaaac 337

10

<210> 44
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 44

ES 2 681 656 T3

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
           20           25           30

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

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

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

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

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

```

5 <210> 45
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 45

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtaatgatt actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac      180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa      300
tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacag          355

```

10
 15 <210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 46

ES 2 681 656 T3

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

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

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 47
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 47

gaaaatgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcttcca gcggggccac tggcatecca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cattatggta gctcaccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

10 <210> 48
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 48

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 51
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 51

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca tcaataagat ctacttagct 120
 tggtagaccgc agaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagtg gaaatcaaac 340

10
 15 <210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 52

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 53
 <211> 355
 5 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 53

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccogt ccctcaagag tcgagttacc atttcagtag ccacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgg tgtattactg tgcgagagag 300
 gctacggagg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

10
 <210> 54
 <211> 118
 <212> PRT
 15 <213> Humana

<400> 54

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Thr Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 55

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagggccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc accacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagget cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatocca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcactgta ttactgtcag cactatggta cctcatogat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

10

<210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 56

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Thr
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Thr Ser Ser
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 57
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 57

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgog gacacggcog tgtattactg tgcgagagaa 300
10 tccacggagc gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg 355

15 <210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> Humana

<400> 58

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 59
 <211> 325
 5 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 59

gaaagtgtgt tgacgcagtc tectggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cotcatatat ggtgtttcca gcagggccac tggcatocca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtga ttactgtcag cagtatggta gctcacgat caccttggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

10
 <210> 60
 <211> 108
 <212> PRT
 15 <213> Humana
 <400> 60

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 61

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gaggacctac 180
 tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 gatattgcag gattcgacc ctagggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacg 355

10

<210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 62

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Ile Ala Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 63
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 63

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctac ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gactccactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtata ttactgtcag cagtatggta gctcacctat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

10 <210> 64
 <211> 108
 <212> PRT
 15 <213> Humana
 <400> 64

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 65
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 65

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgaat actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggtatatct tttacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccggt ccctcaagag tcgagttacc atatcactag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 tccacggagc gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag 355

10

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 66

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 67
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 67

	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcggaaa	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtatcca gtagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caatatggta gctcaatgat cacottcggc	300
10	caagggacac gactggagat taaac	325

15 <210> 68
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 68

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Met
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 69
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 69

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaaggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 ggctctogagg cttttgatat ctgggggtcaa gggacaatgg tcaccgactc ttcag 355

10

15 <210> 70
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 70

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Leu Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Asp Ser Ser
 115

5 <210> 71
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 71

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggttca gtggcagtgg ctctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ctactgtcag cattatggta gctcacttct cactttcggc 300
 ggagggacca aggtggagat caaac 325

10 <210> 72
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 72

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

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

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

5 <210> 73
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 73

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaactcgt ccctcaagag togagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 10 ggccagaacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg 355

15 <210> 74
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 74

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Gln Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 75
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 75

gatgttgatga tgactcagtc tocactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgccctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtac aactggcct 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

10
 15 <210> 76
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 76

ES 2 681 656 T3

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

Lys

<210> 77
 <211> 358
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 77

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cactttcagt aagcctgga tgagctgggt cggccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
 ggggatggaa cgcactttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctcag 358

10

<210> 78
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Humana

15

<400> 78

ES 2 681 656 T3

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

<210> 79
 <211> 322
 5 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 79

gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac	60
atctcctgca aagccagcca agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca	120
ggagaagctg ctatthttcat tattcaagaa getactactc tegtctctgg aatcccacct	180
cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct	240
gaggatgctg catattactt ctgtctacaa catgataatt tcccgcctcac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa ac	322

10
 <210> 80
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> Humana
 <400> 80

ES 2 681 656 T3

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

5 <210> 81
 <211> 379
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 81

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac cacatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa gtcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggg 300
 tatagcagtg gctggtacga ggactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcag 379

10
 15 <210> 82
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 82

ES 2 681 656 T3

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

5 <210> 83
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 83

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtttagtca ggcctcctg catagtgatg gaaagaccta ttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttt 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac 337

10 <210> 84
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Humana

<400> 84

ES 2 681 656 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Phe Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 85
<211> 388
<212> ADN
<213> Humano

<400> 85

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc    60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacttctaca tgagctggat cgcaggct    120
ccagggaagg ggctggaatg gatttcatag attagtagta gtgtagtagc catttactac    180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat    240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attattgtgc gagagaagga    300
tactatgatt cggggagtta ttataaggac tacgactact acggtatgga cgtctggggc    360
caagggacca cggtcaccgt ctctcag                                     388
    
```

10

15 <210> 86
<211> 129
<212> PRT
<213> Humana

<400> 86

ES 2 681 656 T3

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

Ser

5 <210> 87
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 87

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctctgatct atgaagtffc caaccggttc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac 337

10
 15 <210> 88
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 88

ES 2 681 656 T3

```

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

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

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

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

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

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

```

5 <210> 89
 <211> 379
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 89

```

caggtgcggc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat cgcaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtatttc catatactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagga      300
tatagcagct cgtcacatta ctacgactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc      360
acggtcaccg tctcctcag                                     379

```

10 <210> 90
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 90

ES 2 681 656 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Glu Gly Tyr Ser Ser Ser Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 91
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano

<400> 91

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ccctggaca gccggctcc 60
atctoctgca agtctagtca ggcctoctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag gtccttatct atgaagtttc caaccggttc 180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggetgagga tgttgggtt tattactgca tgcaaagtac acagcttctc 300
cggaacttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac 337

10 <210> 92
<211> 112
<212> PRT
<213> Humana

<400> 92

ES 2 681 656 T3

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

<210> 93
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Mono cynomolgus

5

<400> 93

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

10

ES 2 681 656 T3

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp
 165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
 180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
 195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
 210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
 245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
 260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
 290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
 305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
 355 360 365

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

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala
 385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly

ES 2 681 656 T3

405 410 415
Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
420 425 430
Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
435 440 445
Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
450 455 460
Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
465 470 475 480
Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
485 490 495
Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
500

- <210> 94
- <211> 1512
- <212> ADN
- <213> Mono cynomolgus
- <400> 94

ES 2 681 656 T3

atgaccttgg gctccccgag gagaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgacctag 60
 ggtgaccccc tgaagccctc tggggcccc ctggtgacct gcacatgtga gagcccacat 120
 tgcagggggc ctacctgcca gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg 180
 aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgacac gggagctctg cagggggcgc 240
 cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgt gacagccacc tctgcaaccg caacgtgtcc 300
 ctggtgctgg aggccacca aactccttcg gagcagccgg gaacagacag ccagctggcc 360
 ctgatcctgg gccccgtgct ggccttgctg gccctggtgg ccctgggtgt cgtgggcctg 420
 tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cggggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480
 agtctcatcc tgaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540
 gactgcacca cagggagtgg ctgggggctc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg 600
 caggttgect tggtgagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg 660
 tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggacgaaca gtccctggtc 720
 cgggagactg agatctacaa cacagtgttg ctacagacag acaacatcct aggcttcac 780
 gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcattaccac 840
 gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagccgca tttggetctg 900

 aggctagctg tgtccgcagc ctgtggcctg gcacacctgc acgtggagat cttcggta 960
 cagggcaaac cggccattgc ccaccgtgac ttcaagagcc gcaacgtgct ggtcaagagc 1020
 aacctgcagt gttgcattgc tgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat 1080
 tacctggaca tcggcaacaa cccgagagta ggcaccaaga ggtacatggc acccgaggtg 1140
 ctggatgagc agatccgcac ggactgcttt gagtcctata agtggactga catctgggcc 1200
 tttggcctgg tgctgtggga gatgccccgc cggaccatcg tgaacggcat cgtggaggac 1260
 tatagaccac ccttctatga tgtggtgcc aatgacccca gctttgagga catgaagaag 1320
 gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agaccggctc 1380
 ctctcaggcc tagctcagat gatgcccggag tgctggtacc caaacccctc tgcccgactc 1440
 actgcgctgc ggatcaagaa gacactacag aaaattagca acagtccaga gaagcccaaa 1500
 gtgattcagt ag 1512

<210> 95
 <211> 1332
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 95

ES 2 681 656 T3

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtgggtaat actactggaa ctggatccgc      120
cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagtacctac      180
tacaaccctg ccctcaagag togagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag      300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc      360
accaagggcc catcgggtctt ccccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca      420
ggggccctgg gctgcctggg caaggactac ttcccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tectacagtc ctcaggactc      540
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc      600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt      660
tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc      720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac gtgctgggtg      780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag      840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacggt ccgtgtggtc      900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc      960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc     1020

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc     1080
agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1140
aatggggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc     1200
ttcttctctc acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aacctacta cgcagaagag cctctccctg     1320
tctccgggta aa                                                                1332

```

5 <210> 96
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> El cebador directo usado para clonar el DEC de ALK-1

<400> 96
 acggcccagc cggccgacct tggaagccg tct 33

15 <210> 97
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> El cebador inverso usado para clonar el DEC de ALK-1

ES 2 681 656 T3

<400> 97
actaagcttt taatgatgat gatgatgatg ctggccatct gttcccg 47

5
<210> 98
<211> 103
<212> PRT
<213> Humana

10
<400> 98

Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu
1 5 10 15

Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val
20 25 30

Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys
35 40 45

Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val
50 55 60

Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu
65 70 75 80

Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly
85 90 95

Gln His His His His His His
100

15
<210> 99
<211> 387
<212> ADN
<213> Humano

<400> 99

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacgcggccc agccggccga ccctgtgaag ccgtctcggg gcccgctggt gacctgcacg 120

tgtgagagcc cacattgcaa ggggcctacc tgccgggggg cctggtgcac agtagtgctg 180

gtgcgggagg aggggaggca cccccaggaa catcggggct gcgggaactt gcacagggag 240

ctctgcaggg ggcgccccac cgagttcgtc aaccactact gctgcgacag ccacctctgc 300

aaccacaacg tgtccctggt gctggaggcc acccaacctc cttcggagca gccgggaaca 360

20 gatggccagc atcatcatca tcatcat 387

<210> 100
<211> 444
<212> PRT
25 <213> Humana

ES 2 681 656 T3

<400> 100

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Gly
 20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

ES 2 681 656 T3

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

ES 2 681 656 T3

	355		360		365														
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro				
	370					375					380								
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser				
385					390					395					400				
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln				
				405					410					415					
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His				
			420					425					430						
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
		435					440												

5 <210> 101
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 101

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc      60
ctctoctgta gggccagtca gagggtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgcgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatccagag aggcocaaagt acagtggaag gtggataacg ccotccaatc gggtaaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                          645
  
```

10
 15 <210> 102
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 102

ES 2 681 656 T3

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

<210> 103
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 103

ES 2 681 656 T3

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaaggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gactacctac 180
 tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

5 <210> 104
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <400> 104

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

15 <210> 105
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de amplificación usado para clonar 1.12.1 de longitud completa

<400> 105
 tctcaagct tgatatctct agaagccgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcc 58

ES 2 681 656 T3

5
<210> 106
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador de amplificación usado para clonar 1.12.1 de longitud completa
<400> 106
10 ttctctgac agaattccta ctatttacc ggagacaggg agagggc 46
<210> 107
<211> 48
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador de amplificación usado para clonar 1.12.1 de longitud completa
20 <400> 107
tcttcaagct tcccgggagc cgccaccatg gaaaccccag cgcagctt 48
<210> 108
<211> 49
25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador de amplificación usado para clonar 1.12.1 de longitud completa
30 <400> 108
ttctttgac agaatttcca ctaacactct ccctgttga agctctttg 49
<210> 109
<211> 32
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
40 <223> Oligonucleótido mutagénico
<400> 109
ctccagggga aagagccacc ctctctgta gg 32
45 <210> 110
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial
50 <220>
<223> Oligonucleótido mutagénico
<400> 110
55 cctacaggag aggggtggctc ttcccctgg ag 32
<210> 111
<211> 30
60 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Oligonucleótido mutagénico
<400> 111

ES 2 681 656 T3

ggggctcca tcagcagtg tgaatactac 30

5 <210> 112
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido mutagénico

15 <400> 112
gtagtattca ccaactgctga tggagccacc 30

20 <210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Humana

<400> 113

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
1 5

25 <210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> Humana

<400> 114

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
1 5

30

35 <210> 115
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador directo

<400> 115
agcgggcca gagggaccat g 21

45 <210> 116
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador inverso

<400> 116
cagaaaggaa tcaggtgctc ctgggcta 28

55 <210> 117
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Cebador directo

ES 2 681 656 T3

<400> 117
gattatggcc ttgggctccc ccaggaaa 28

5 <210> 118
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador inverso

<400> 118
gggcattga atcacttag gcttctctgg actgtg 37

15 <210> 119
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Sonda TaqMan (sonda ID1)

<400> 119
ccagcagtc atcgactaca tcagga 27

25 <210> 120
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador de PCR TaqMan (ID1-F)

<400> 120
aaggtgagca aggtggagat tc 22

35 <210> 121
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador de PCR TaqMan (ID1-R)

45 <400> 121
ttccgagtc agctccaact g 21

50 <210> 122
<211> 25
<212> PRT
<213> Humana

<400> 122

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

55 <210> 123
<211> 12

ES 2 681 656 T3

<212> PRT
 <213> Humana

5 <400> 123

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5 10

<210> 124
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <400> 124

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

15 <210> 125
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Humana

20 <400> 125

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5 10

25 <210> 126
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

30 <400> 126

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60
 ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

35 <210> 127
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

40 <400> 127

ES 2 681 656 T3

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

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 128
- <211> 1332
- <212> ADN
- <213> Humano

- <400> 128

5

ES 2 681 656 T3

```

caggtgcagc tgcaggagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatgagc agtgggtaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccacg ggaagggcct ggagtgatt gggtagatct attacagtgg gactacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccttgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gcgccctctg gctgcctctg caaggactac ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac 480
tcaggcgcct tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaagt 660
tgtgtcagat gccaccctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttctcttc 720
ccccaaaaa ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac gtgctggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctcccagc cccatcgag aaaacctct ccaaaccac agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccagtc 1080
agcctgacct gcctgtgcaa aggttctac cccagcgaca tcgcccgtga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggaact cgacggctcc 1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcagg gaaactctc 1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgac aaccactaca cgagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

```

5 <210> 129
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 129

```

caggtgcagc tgcaggagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatgagc agtgggtaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccacg ggaagggcct ggagtgatt gggtagatct attacagtgg gactacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccttgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

```

10
 15 <210> 130
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 130

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
 1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
 20 25 30

ES 2 681 656 T3

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

ES 2 681 656 T3

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
 290 295 300
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
 305 310 315 320
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
 325 330 335
 Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 340 345 350
 Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
 355 360 365
 Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
 370 375 380
 Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala
 385 390 395 400
 Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly
 405 410 415
 Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
 420 425 430
 Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
 435 440 445
 Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
 450 455 460
 Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
 465 470 475 480
 Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
 485 490 495
 Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
 500

5 <210> 131
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 131

ES 2 681 656 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ile Ala Val Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 132
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

5

<400> 132

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

10

ES 2 681 656 T3

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

5
 <210> 133
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 133

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

10

<210> 134
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 134

15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

ES 2 681 656 T3

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg

5
<210> 135
<211> 108
<212> PRT
<213> Humana

<400> 135

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Phe Gly Ser Ser Pro
85 90 95

10
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

15
<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> Humana

<400> 136

20
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo monoclonal neutralizante anti ALK-1, o parte de unión a antígeno del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer hepatobiliar, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, mesotelioma o cáncer de la uretra en un ser humano que lo necesite, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios variables de cadena pesada y ligera, respectivamente, de

5
10
15
20

SEQ ID NO: 6 y 8;
SEQ ID NO: 14 y 16;
SEQ ID NO: 18 y 20;
SEQ ID NO: 26 y 28;
SEQ ID NO: 30 y 32;
SEQ ID NO: 38 y 40;
SEQ ID NO: 46 y 48;
SEQ ID NO: 50 y 52;
SEQ ID NO: 54 y 56;
SEQ ID NO: 58 y 60;
SEQ ID NO: 62 y 64;
SEQ ID NO: 66 y 68; o
SEQ ID NO: 70 y 72.

2. Un anticuerpo monoclonal neutralizante anti ALK-1 o parte de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer hepatobiliar, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, mesotelioma o cáncer de la uretra en un ser humano que lo necesite, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios variables de cadena pesada y ligera, respectivamente, de

25
30
35

SEQ ID NO: 6 y 8;
SEQ ID NO: 14 y 16;
SEQ ID NO: 18 y 20;
SEQ ID NO: 26 y 28;
SEQ ID NO: 30 y 32;
SEQ ID NO: 38 y 40;
SEQ ID NO: 46 y 48;
SEQ ID NO: 50 y 52;
SEQ ID NO: 54 y 56;
SEQ ID NO: 58 y 60;
SEQ ID NO: 62 y 64;
SEQ ID NO: 66 y 68; o
SEQ ID NO: 70 y 72.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los dominios V_H y V_L del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprenden las siguientes secuencias, respectivamente:

40
45
50
55

SEQ ID NO: 6 y 8;
SEQ ID NO: 14 y 16;
SEQ ID NO: 18 y 20;
SEQ ID NO: 26 y 28;
SEQ ID NO: 30 y 32;
SEQ ID NO: 38 y 40;
SEQ ID NO: 46 y 48;
SEQ ID NO: 50 y 52;
SEQ ID NO: 54 y 56;
SEQ ID NO: 58 y 60;
SEQ ID NO: 62 y 64;
SEQ ID NO: 66 y 68;
SEQ ID NO: 70 y 72;
SEQ ID NO: 104 y 127; o

la secuencia de aminoácidos de V_H codificada por la secuencia de nucleótidos del inserto hallado en el clon depositado con el número de acceso de ATCC PTA-6864 y la secuencia de aminoácidos de V_L codificada por la secuencia de nucleótidos del inserto hallado en el clon depositado con el número de acceso de ATCC PTA-6865.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8.

60

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera, respectivamente, de
- 5 SEQ ID NO: 2 y 4;
 SEQ ID NO: 100 y 102;
 SEQ ID NO: 2 y 102; o
 SEQ ID NO: 100 y 4.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 4.
7. El uso del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, o el anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el anticuerpo es una molécula de IgG.
8. El uso del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es una molécula de IgG₁ o IgG₂.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno se derivatiza o se une a otra molécula.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la molécula es un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, un péptido o una proteína.
11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 y 7-10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-10, en el que el uso es en el tratamiento del carcinoma de células renales.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el uso es en el tratamiento del carcinoma de células renales.
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 y 7-10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer colorrectal.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer colorrectal.
15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 y 7-10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-10, en el que el uso es en el tratamiento del mesotelioma.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el uso es en el tratamiento del mesotelioma.
17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 y 7-10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer de la uretra.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer de la uretra.
19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 y 7-10, o el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer hepatobiliar.

FIG. 1

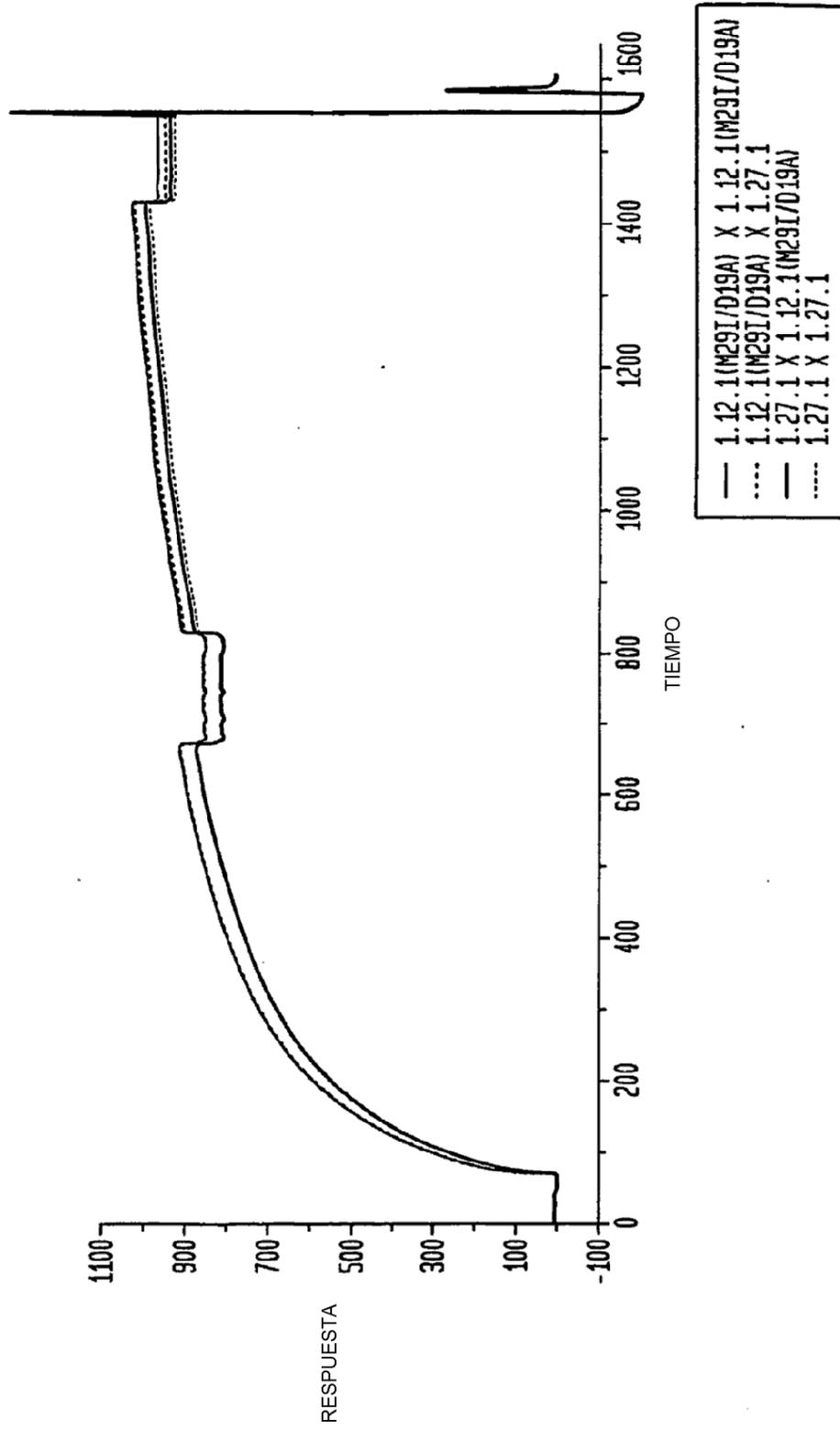


FIG. 2

Humana	MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEG	60
Cino	MTLGSPRRGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCRGPTCQGAWCTVVLVREEG	60
	*****:*****:****:*****	
Humana	RHPQEHRCGNLHRELCRGPTFVNHYCCDShLCNHVSLVLEATQPPSEQPGTDGQLA	120
Cino	RHPQEHRCGNLHRELCRGPTFVNHYCCDShLCNRVSLVLEATQTPSEQPGTDSQLA	120
	*****:*****:*****:*****	
Humana	LILGPVLALLALVALGVLGLWHVRRRQEKQRGLHSELGESSLILKASEQGDMLGDLLDS	180
Cino	LILGPVLALLALVALGVVGLWHVRRRQEKQRGLHSELGESSLILKASEQGDMSMLGDLLDS	180
	*****:*****:*****:*****	
Humana	DCTTGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF	240
Cino	DCTTGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF	240
	*****:*****:*****:*****	
Humana	RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLI THYHEHGSlyDFLQRQTLEPHLAL	300
Cino	RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLI THYHEHGSlyDFLQRQTLEPHLAL	300
	*****:*****:*****:*****	
Humana	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIADLGLAVMHSQ6SD	360
Cino	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIADLGLAVMHSQ6SD	360
	*****:*****:*****:*****	
Humana	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTD CFESYKWDIWFGLVLWEIARRTIVNGIVED	420
Cino	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTD CFESYKWDIWFGLVLWEIARRTIVNGIVED	420
	*****:*****:*****:*****	
Humana	YRPPFYDVPNDPSFEDMKKVVCVDDQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMMRECWYPNPSARL	480
Cino	YRPPFYDVPNDPSFEDMKKVVCVDDQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMMRECWYPNPSARL	480
	*****:*****:*****:*****	
Humana	TALRIKKTLOKISNSPEKPKVIQ 503 (SEC. ID N° :130)	
Cino	TALRIKKTLOKISNSPEKPKVIQ 503 (SEC. ID N° :93)	
	*****:*****:*****:*****	

FIG. 3A

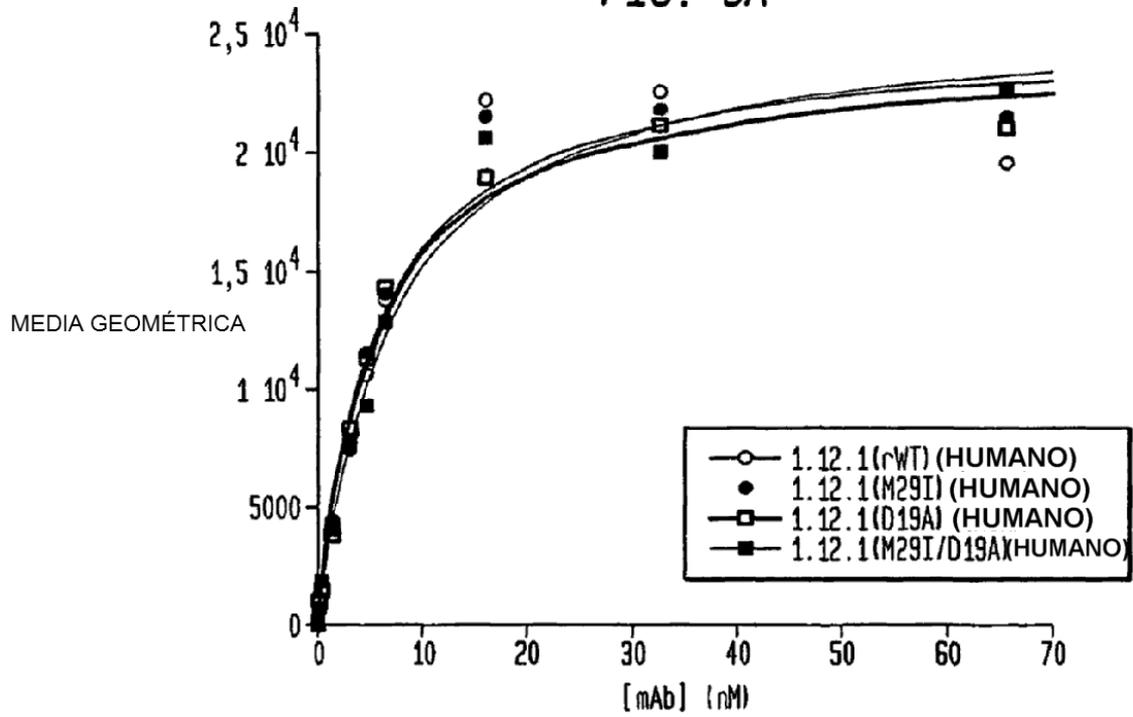


FIG. 3B

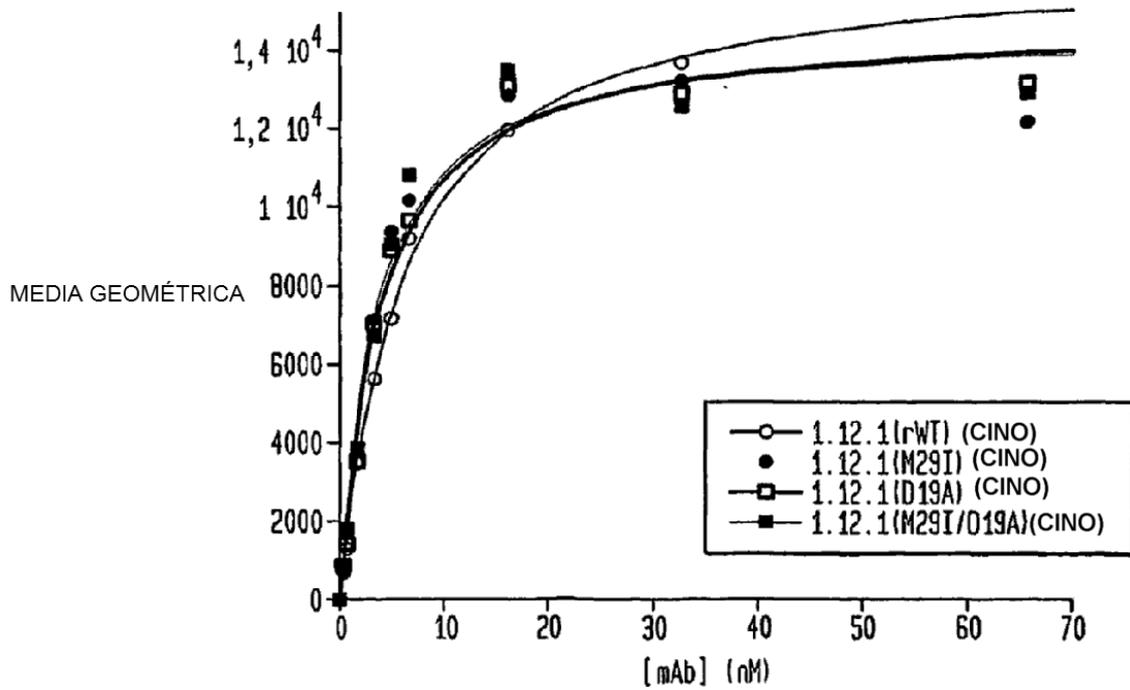


FIG. 4

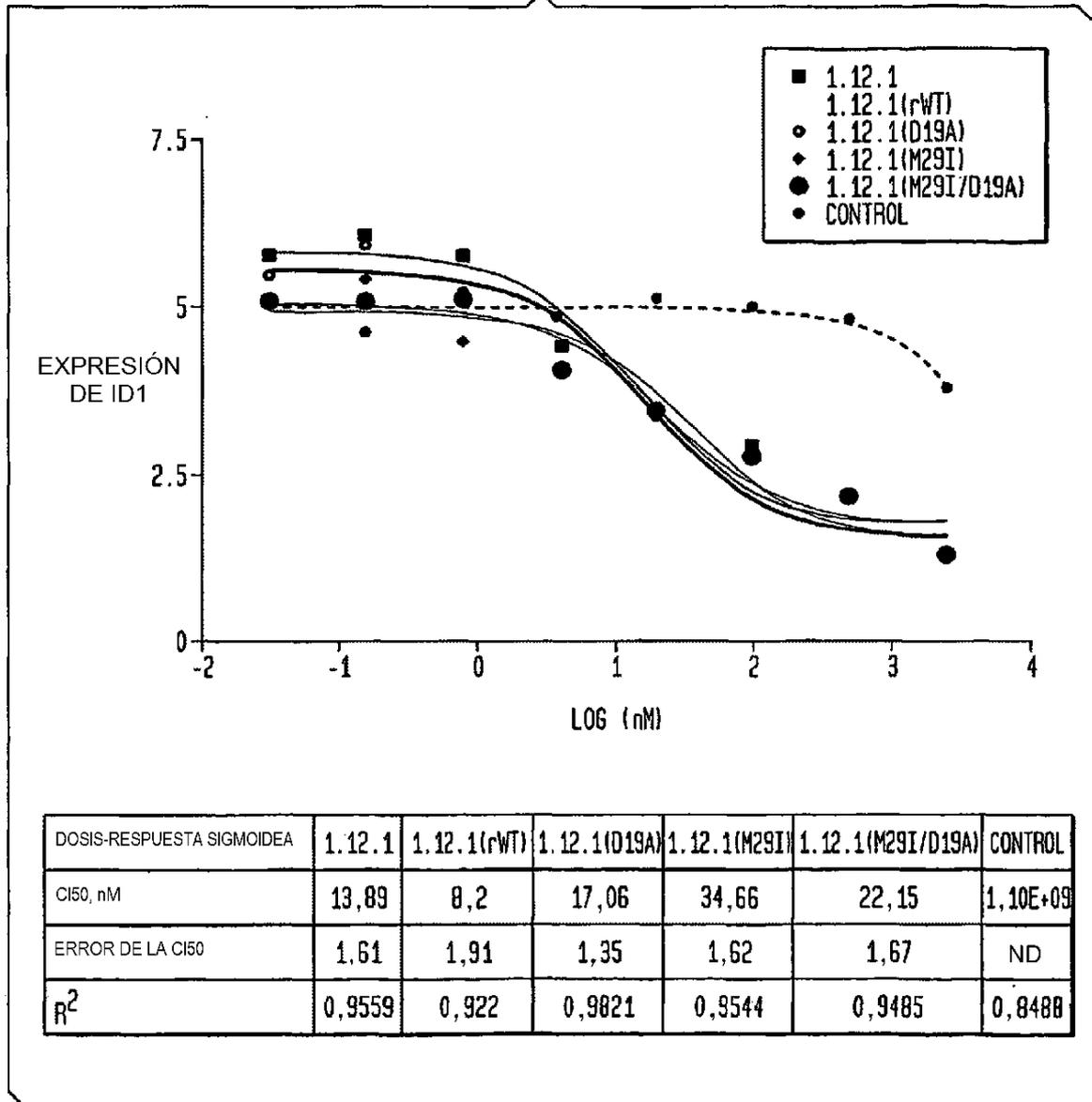
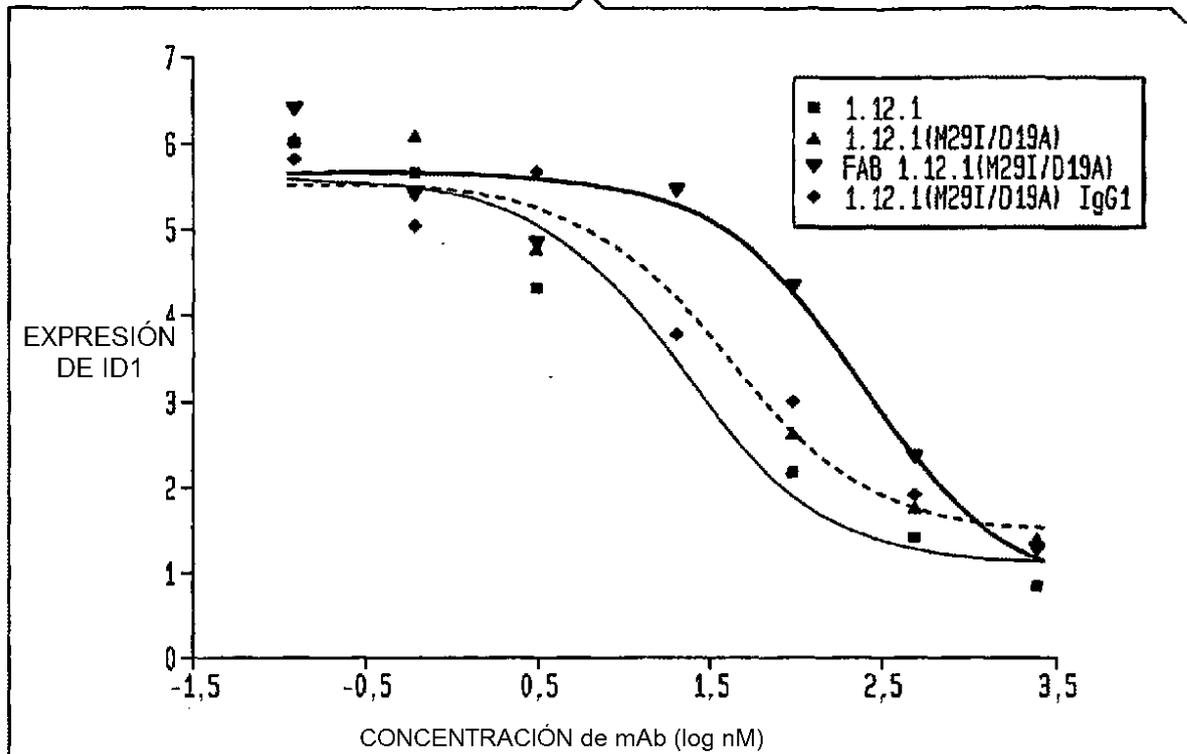


FIG. 5



DOSIS-RESPUESTA SIGMOIDEA	1.12.1	1.12.1(M29I/D19A)	FAB 1.12.1(M29I/D19A)	1.12.1(M29I/D19A) IgG1
CI_{50} , nM	22,81	17,62	254,00	40,95
ERROR DE LA CI_{50}	1,62	1,49	1,83	1,65
R^2	0,96	0,97	0,94	0,96

FIG. 6A

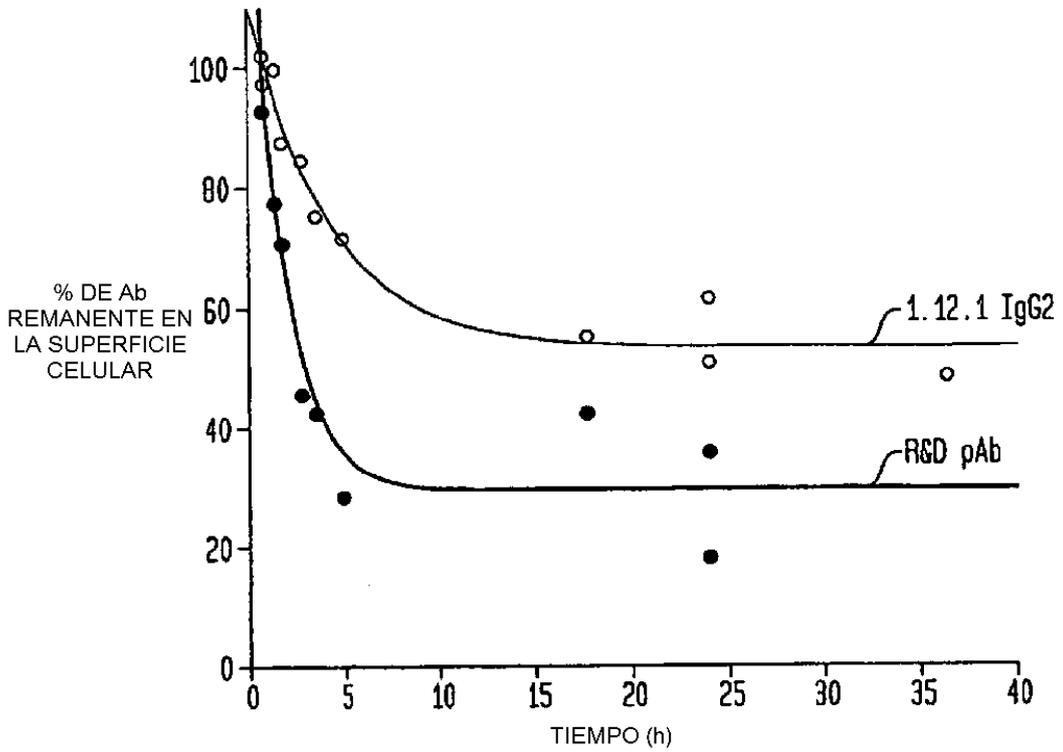


FIG. 6B

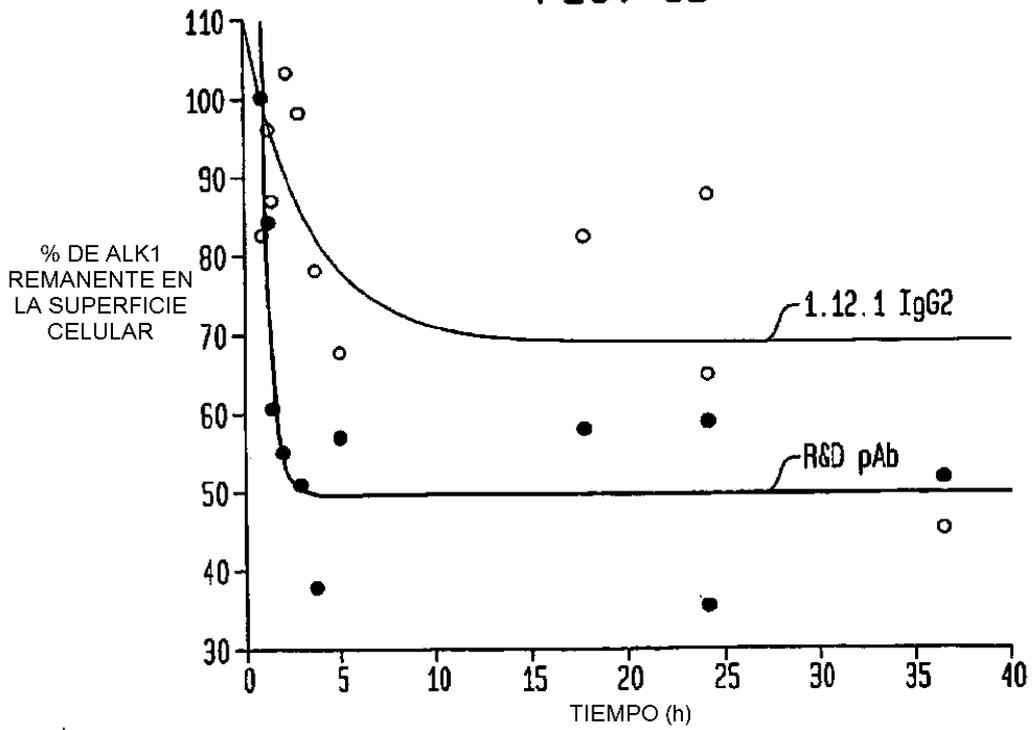


FIG. 7A

1.12.1 VH

Expresada: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLTCTVSGGSMSSGEYYW~~NIROHPGKGLEWIGYIYSGSTY 60
 (SEC. ID N°: 104)
 Línea germinal: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLTCTVSGGSISSGGYYW~~NIROHPGKGLEWIGYIYSGSTY 60
 (SEC. ID N°: 131)

Expresada: 61 YNPSLKS~~SRVTISVDTSKNQFSLKLS~~SVTAADTAVYYCARE-SVAG-FDYWGQGT~~LVTVSS~~ 118
 Línea germinal: 61 YNPSLKS~~SRVTISVDTSKNQFSLKLS~~SVTAADTAVYYCARGIAVAGYFDYWGQGT~~LVTVSS~~ 120

1.12.1 VL

Expresada: 1 EIVLTQSPGTL~~SLSPGERDTL~~SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG~~TSS~~RATGIP 60
 (SEC. ID N°: 127)
 Línea germinal: 1 EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG~~ASS~~RATGIP 60
 (SEC. ID N°: 132)

Expresada: 61 DRFSGSGSGTDFTL~~ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGG~~TRLEIK 108
 Línea germinal: 61 DRFSGSGSGTDFTL~~ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGG~~TRLEIK 108

FIG. 7B

	10	20	30	
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERD	TLSCRASQSVS	1.12.1 VL (SEC ID 127)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	1.14.1 VL (SEC ID 20)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	1.162.1 VL (SEC ID 28)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	1.31.1 VL (SEC ID 135)
1	ESVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	4.62.1 VL (SEC ID 60)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	4.72.1 VL (SEC ID 68)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	(A27) (SEC ID N°:133)
	40	50	60	
31	SSYLAWYQOKP	GQAPRLLIYG	TSSSRATGIP	1.12.1 VL
31	STYLAWHQOKP	GQAPRLLIYG	VSSSRASGVP	1.14.1 VL
31	SSYLAWYQOKP	GQAPRLLIYG	ASSSRATGIP	1.162.1 VL
31	SSYLAWYQOKP	GQAPRLLIYG	ASSSRATGIP	1.31.1 VL
31	SSYLAWYQOKP	GQAPRLLIYG	VSSSRATGIP	4.62.1 VL
31	SSYLAWYQRK	KPGQAPRLLIYG	VSSSRATGIP	4.72.1 VL
31	SSYLAWYQOKP	GQAPRLLIYG	ASSSRATGIP	Linea germinal (A27)
	70	80	90	
61	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	1.12.1 VL
61	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	1.14.1 VL
61	DRFSGSGSGT	DFTLTIRLD	PEDFAVYYCQ	1.162.1 VL
61	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	1.31.1 VL
61	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	4.62.1 VL
61	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	4.72.1 VL
61	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	Linea germinal (A27)
	100			
91	QYGSSPITFG	QGTRLEIK		1.12.1 VL
91	QYGSSPITFG	QGTRLEIK		1.14.1 VL
91	RYGSSPITFG	QGTRLEIK		1.162.1 VL
91	HFGSSPITFG	QGTRLEIK		1.31.1 VL
91	QYGSSPITFG	QGTRLEIK		4.62.1 VL
91	QYGSSMITFG	QGTRLEIK		4.72.1 VL
91	QYGSSP			Linea germinal (A27)

FIG. 7C

	10	20	30	
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSM S 1.12.1 VH (SEC ID 104)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 1.151.1 VH (SEC ID 22)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 1.162.1 VH (SEC ID 26)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 1.8.1 VH (SEC ID 34)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4.24.1 VH (SEC ID 46)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4.38.1 VH (SEC ID 50)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4.58.1 VH (SEC ID 54)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4.62.1 VH (SEC ID 58)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4.68.1 VH (SEC ID 62)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4.72.1 VH (SEC ID 66)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 5.13.1 VH (SEC ID 70)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 5.34.1 VH (SEC ID 74)
1	QVQLQESG	PGLVKPSQ	TLSTLCTV	SGGSI S 4-31 Línea germinal (SEC ID N°: 134)

	40	50	60	
31	SGEYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 1.12.1 VH
31	SGGHYWSW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 1.151.1 VH
31	SGEYYWSW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 1.162.1 VH
31	SGGHYWSW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSAY 1.8.1 VH
31	SNDYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 4.24.1 VH
31	SGDYYWSW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 4.38.1 VH
31	SGDYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 4.58.1 VH
31	SGDYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 4.62.1 VH
31	SGDYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 4.68.1 VH
31	SGEYYWSW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YFYSGSTY 4.72.1 VH
31	SGDYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 5.13.1 VH
31	SGDYYWNW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 5.34.1 VH
31	SGGYYWSW	IRQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY 4-31 Línea germinal

FIG. 7D

	70	80	90	
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			1.12.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			1.151.1 VH
61	Y N P S L K S R L T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			1.162.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			1.8.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			4.24.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S I D T S K N Q F S L K L S S V T A A			4.38.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V A T S K N Q F S L K L S S V T A A			4.58.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			4.62.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			4.68.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S L D T S K N Q F S L K L S S V T A A			4.72.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			5.13.1 VH
61	Y N S S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			5.34.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A			4-31 Linea germinal

91	D T A V Y Y C A R			1.12.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			1.151.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			1.162.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			1.8.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4.24.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4.38.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4.58.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4.62.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4.68.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4.72.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			5.13.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			5.34.1 VH
91	D T A V Y Y C A R			4-31 Linea germinal

FIG. 8

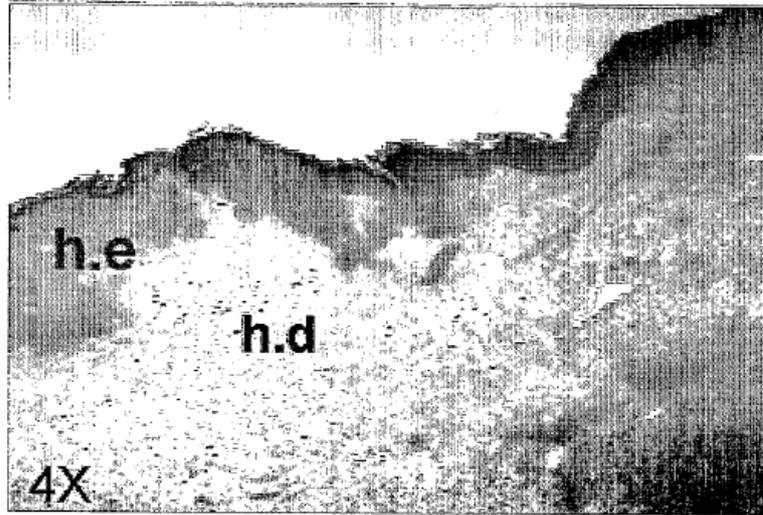


FIG. 9A



FIG. 9B

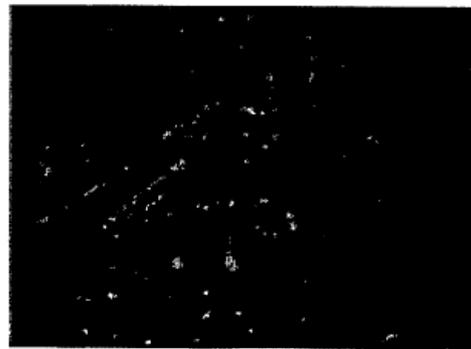


FIG. 10



FIG. 11

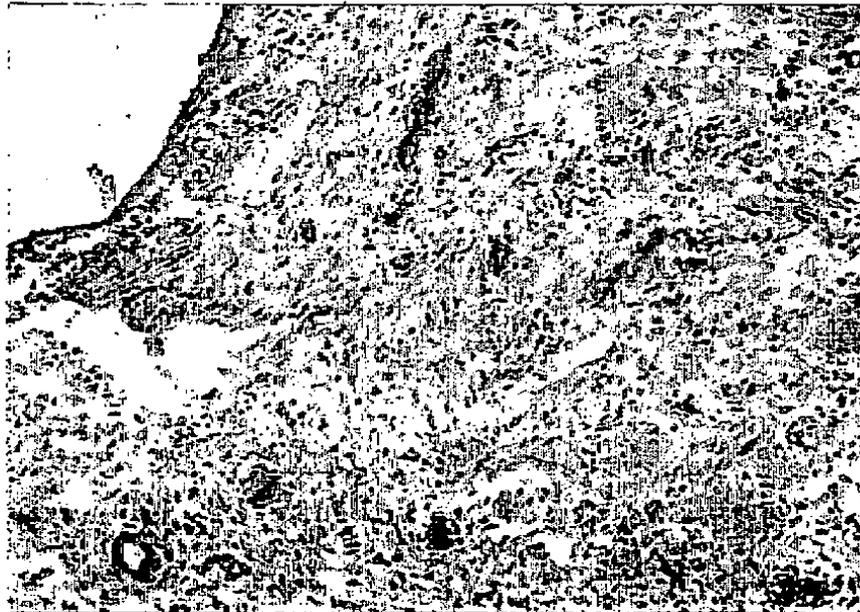
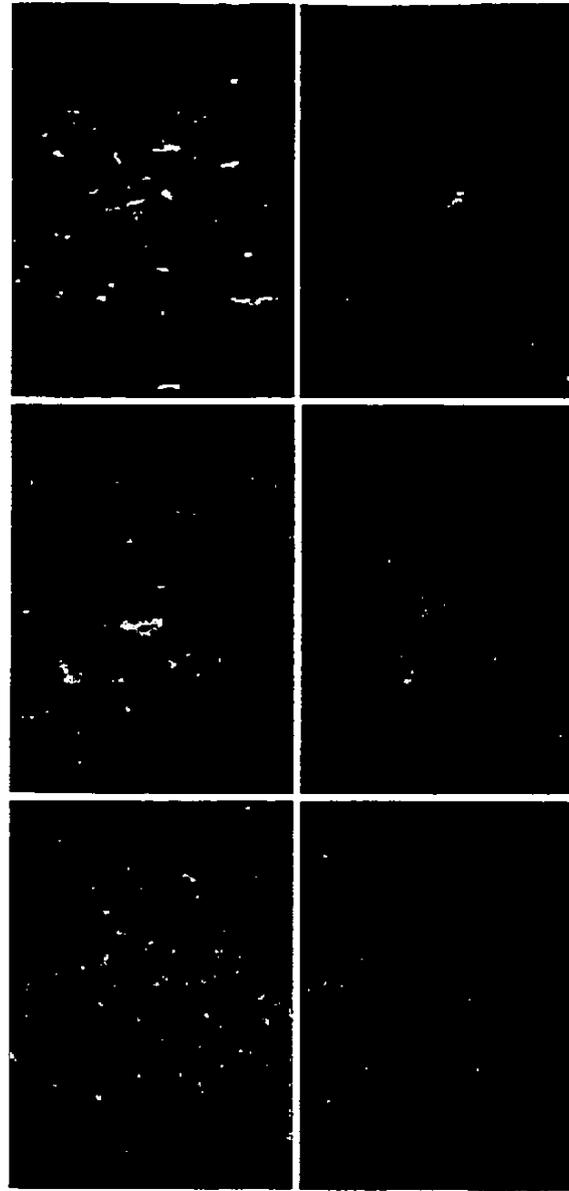


FIG. 12



IgG HUMANA DE CONTROL
10mg/kg, IV

1.12.10M29I/D19A1
10mg/kg, IV

CD31 HUMANO - ROJO
CD31 DE RATÓN - VERDE
AUMENTO: 20X

FIG. 13

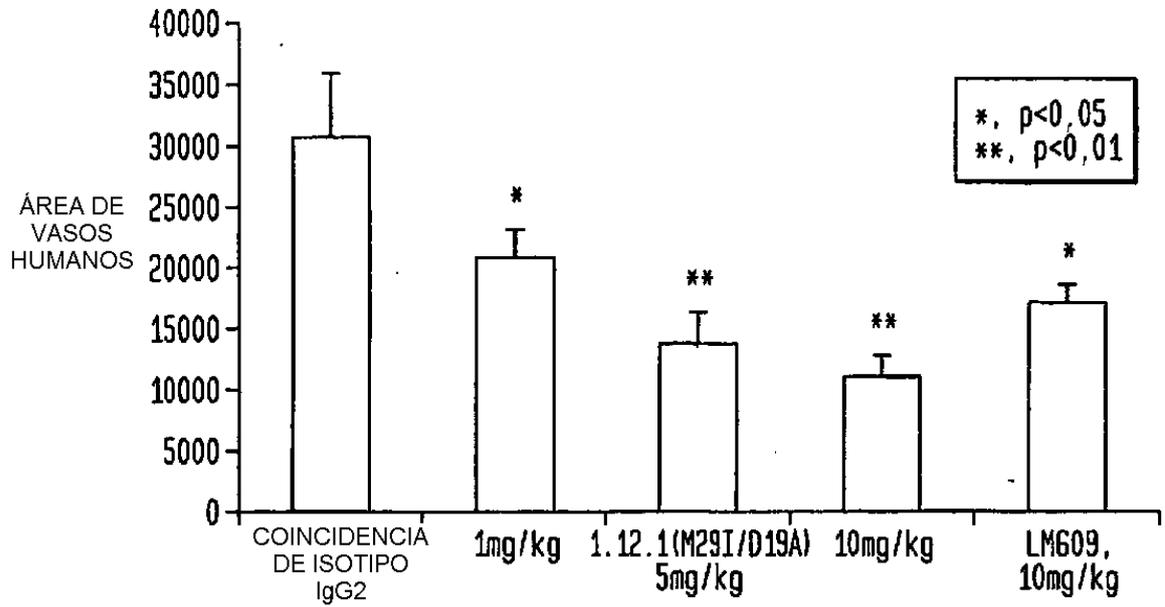


FIG. 14

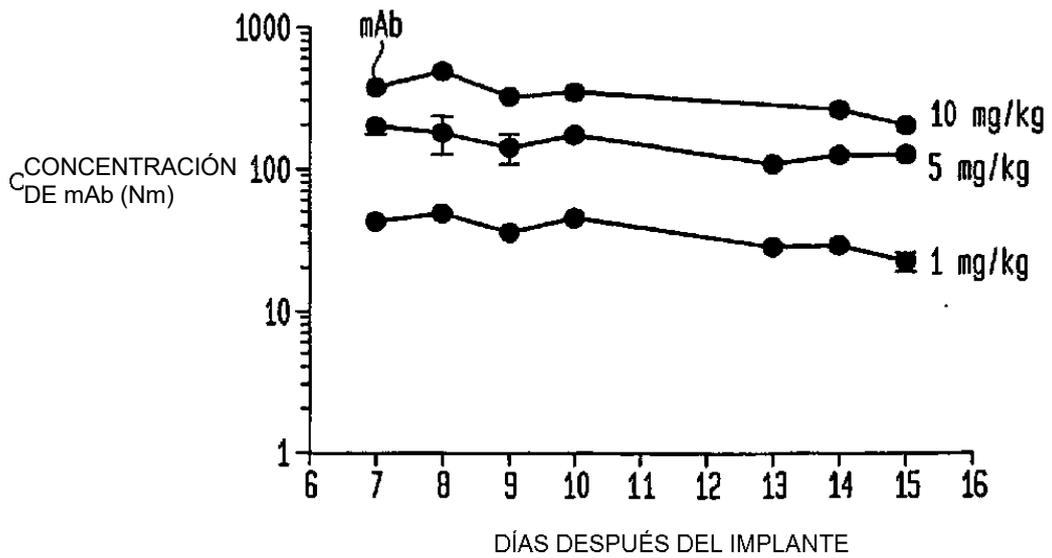


FIG. 15

