(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 841 249**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2015 PCT/EP2015/059050**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162292**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2015 E 15727884 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2020 EP 3134438**

(54) Título: **Anticuerpo IGF-1R y su utilización como un vehículo de direccionamiento para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

25.04.2014 US 201461984160 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2021

(73) Titular/es:

PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

(72) Inventor/es:

GOETSCH, LILIANE;
BROUSSAS, MATTHIEU;
BEAU-LARVOR, CHARLOTTE;
CHAMPION, THIERRY y
ROBERT, ALAIN

(74) Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo IGF-1R y su utilización como un vehículo de direccionamiento para el tratamiento del cáncer

Descripción

Se divulgan en la presente memoria nuevos anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, capaces de unirse a IGF-1R, así como secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos. En un aspecto, la divulgación se refiere a un nuevo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse a IGF-1R e induciendo la internalización de IGF-1R, ser internalizado en la célula. Se describe asimismo la utilización de dicho anticuerpo como un producto o vehículo de direccionamiento ("addressing") en conjugación con otros compuestos anticancerígenos como toxinas, radioelementos o fármacos, y la utilización de los mismos para el tratamiento de cierto cáncer.

El receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina llamado IGF-1R (también llamado IGF1R o IGF-IR) es un receptor con la actividad de la tirosina cinasa que presenta la homología del 70% con el receptor de insulina IR. El IGF-1R es una glucoproteína con peso molecular de aproximadamente 350,000. Es un receptor hetero-tetramérico del cual cada mitad, unida por puentes disulfuro, está compuesta por una subunidad-α extracelular y una subunidad-β transmembranaria. IGF-1R une a IGF1 e IGF2 con una afinidad muy elevada (Kd #1nM), pero es igualmente capaz de la unión a la insulina con una afinidad 100 a 1000 veces más baja. A la inversa, el IR une la insulina con una afinidad muy elevada aunque los IGF sólo se unan con el receptor de insulina con unas 100 veces de afinidad inferior. Los dominios de la tirosina cinasa de IGF-1R y de IR presentan una homología de la secuencia muy elevada aunque las zonas de la homología más débil respectivamente conciernan a la región rica en la cisteína situada en el subunidad-α y la parte C-terminal de la subunidad-β. Las diferencias de la secuencia observadas en la subunidad-α se sitúan en la zona de unión de los ligandos y son por lo tanto el origen de las afinidades relativas de IGF-1R y de IR para el IGF y la insulina respectivamente. Las diferencias en la parte C-terminal de la subunidad-β dan como resultado una divergencia en las vías de señalización de los dos receptores; efectos de antiapoptosis, diferenciación, mitogénicos que median IGF-1R, mientras la activación del IR principalmente implica efectos al nivel de las vías metabólicas.

Las proteínas de tirosina cinasa citoplásmica son activadas por la unión del ligando al dominio extracelular del receptor. La activación de las cinasas por su parte implica el estímulo de diferentes sustratos intracelulares, incluso IRS-1, IRS-2, Shc y Grb 10. Los dos sustratos principales de IGF-1R son IRS y Shc que regulan, por la activación de diversos efectores en dirección 3', la mayoría de los efectos del crecimiento y diferenciación conectados con la unión del IGF a este receptor. La disponibilidad de sustratos puede dictar por consiguiente el efecto biológico final conectado con la activación del IGF-1R. Cuando IRS-1 predomina, las células tienden a proliferar y transformarse. Cuando el Shc domina, las células tienden a diferenciarse. Parece que la ruta principalmente implicada para los efectos de protección contra apoptosis es la ruta de fosfatidilinositol 3-cinasas (PI 3-cinasas).

La función del sistema IGF en la carcinogénesis se ha convertido en el objeto de una investigación intensiva en los diez años pasados. Este interés siguió al descubrimiento del hecho de que además de sus propiedades mitogénicas y propiedades de antiapoptosis, parece que IGF-1R se requiere para el establecimiento y el mantenimiento de un fenotipo transformado. De hecho, ha estado bien establecido que una sobreexpresión o una activación constitutiva de IGF-1R conduce, en una gran variedad de células, a una proliferación de las células independientes del soporte en medios carentes del suero fetal de ternera, y a la formación de tumores en ratones desnudos. Esto en sí mismo no es una propiedad exclusiva ya que una gran variedad de productos de genes sobreexpresados puede transformar células, incluso un buen número de receptores de factores de crecimiento. Sin embargo, el descubrimiento crucial que ha demostrado claramente el rol principal desempeñado por IGF-1R en la transformación ha sido la demostración de que las células IGF-1R^{-}, en las cuales el gen que codifica IGF-1R se ha inactivado, son totalmente resistentes a la transformación por diferentes agentes que son por lo general capaces de transformar las células, como la proteína E5 del virus del papiloma bovino, una sobreexpresión de EGFR o de PDGFR, el antígeno T de SV 40, ras activada o la combinación de estos dos últimos factores.

El IGF-1R se expresa en una gran variedad de tumores y de líneas tumorales y los IGF amplifican la proliferación tumoral mediante su unión a IGF-1R. Otros argumentos a favor de la función de IGF-1R en la carcinogénesis proceden de estudios que utilizan anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra el receptor o que utilizan dominantes negativas de IGF-1R. De hecho, los anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra IGF-1R inhiben la proliferación de numerosas líneas celulares en el cultivo y el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Se ha mostrado igualmente que una dominante negativa de IGF-1R tiene capacidad de inhibir la proliferación tumoral.

En tal contexto IGF-1R se ha considerado mucho tiempo como un objetivo interesante en la oncología. Una gran cantidad de proyectos que se dirigen a IGF-1R (anticuerpos humanizados o de humano o moléculas pequeñas) se ha iniciado para desarrollar anticuerpos IGF-1R para el tratamiento de cánceres y más de 70 ensayos clínicos se han llevado a cabo en diversas indicaciones. Por ejemplo, el documento 2008/079849 divulga anticuerpos de IGF-1R y su actividad antitumoral. Sin embargo, hasta el momento, ninguno de estos proyectos ha tenido éxito y no

existen anticuerpos IGF-1R en el mercado a pesar de la sobreexpresión frecuente de este objetivo descrito para muchos pacientes en una amplia serie de indicaciones.

Además, una serie de ensayos clínicos que implican anticuerpos anti-IGF-1R combinados a anticuerpos anti-EGFR a fin de dirigirse tanto a EGFR como IGF-1R, ha fallado ya que ninguno de estos anticuerpos era capaz de tratar a pacientes de mutante KRAS.

Como una consecuencia, IGF-1R no se considera ahora como un objetivo principal y, en la investigación de anticuerpos terapéuticos potenciales, IGF-1R ya no parece considerado como de particular interés.

Sin embargo, también debe apreciarse que en los esfuerzos para generar anticuerpos IGF-1R se concentraron en anticuerpos desnudos, es decir anticuerpos útiles por sus propiedades intrínsecas. En este sentido, IGF-1R se considera como un objetivo no adecuado para la generación de un inmunoconjugado como un conjugado anticuerpo-fármaco (al que se hace referencia como “ADC”) ya que IGF-1R se describe como un objetivo también extensamente expresado por células normales, incluso vasos sanguíneos. En este sentido, puede apreciarse que el anticuerpo IGF-1R más reciente, es decir AVE1642, se desarrolla como un anticuerpo desnudo no armado con un fármaco. Es lo mismo con los otros anticuerpos IGF-1R actualmente en el desarrollo y con todos aquellos que fallaron en ensayos clínicos.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualesquier otros aspectos o formas de realización expuestos en la presente memoria son únicamente para información.

La presente divulgación tiende a remediar estas cuestiones y está describiendo un anticuerpo IGF-1R capaz de unirse a IGF-1R de una manera específica como es adecuado para usarse armado con un fármaco. Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo IGF-1R que presenta propiedades particulares tal como que es un candidato perfecto para utilizarse armado en el contexto de un inmunoconjugado.

En una primera forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que i) se une con IGF-1R de humano, y ii) se interioriza siguiendo a su unión a dicho IGF-1R de humano.

Los términos "anticuerpo", “anticuerpos”, “ab”, “Ab” o "inmunoglobulina" se usan de modo indistinto en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos aislados, genomanipulados, sintetizados químicamente, o recombinantes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de cadena completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes o anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y también fragmento de anticuerpo, en tanto que muestran la actividad biológica deseada. Particularmente, se proporciona un anticuerpo recombinante.

Más particularmente, tal molécula consiste en una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (o dominio) (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones base (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, que se disponen desde el extremo amino al extremo carboxi en el sigue orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden regular la unión de la inmunoglobulina para recibir tejidos o factores, incluso diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

Por “fragmento de unión a IGF-1R” o “el fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo, se pretende indicar cualquier péptido, polipéptido o proteína que mantiene la capacidad de unirse con la diana (a la que se hace referencia generalmente como antígeno) del anticuerpo.

En una forma de realización, tales “fragmentos de unión al antígeno” se seleccionan en el grupo que consiste en Fv, scFv (sc para la cadena individual), Fab, $F(ab')_2$, Fab’, los fragmentos scFv-Fc o los diacuerpos, o cualquier fragmento del cual el período de tiempo de la semivida se habría aumentado por la modificación química, como la adición de poli(alquilen)glicol tal como poli(etilen) glicol (“pegilación”) (fragmentos pegilados llamados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG o Fab’-PEG) (“PEG” para poli (etilen) glicol), o por la internalización en un liposoma, presentando dichos fragmentos por lo menos una de las CDR características del anticuerpo de interés. Preferentemente, dichos “fragmentos de unión al antígeno” se constituirán por o comprenderán una secuencia parcial de cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual derivan, siendo dicha secuencia parcial para mantener la misma especificidad de la unión que el anticuerpo del cual desciende y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, en una manera más preferida por lo menos 1/10, de la afinidad del

anticuerpo del cual desciende, con respecto al objetivo. Más preferentemente, dichos “fragmentos de unión al antígeno” se constituirán por o comprenderán por lo menos la tres CDR-H1 de CDR, CDR-H2 y CDR-H3 de cadena variable pesada y la tres CDR-L1 de CDR, CDR-L2 y CDR-L3 de cadena variable ligera del anticuerpo del cual derivan.

Mediante “unir”, “une”, o similar, se pretende que el anticuerpo o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, forme un complejo con un antígeno que es relativamente estable en estados fisiológicos. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio de por lo menos sobre $1x10^{-6}$ M o menos. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la diálisis de equilibrio, la resonancia plasmónica de superficie, y similar. Para evitar dudas, no significa que dicho anticuerpo no podría unirse o interferir, a un bajo nivel, con otro antígeno. Sin embargo, como una forma de realización, dicho anticuerpo únicamente se une a dicho antígeno.

Como se utiliza como en la presente memoria descriptiva, la expresión “anticuerpo IGF-1R” debería interpretarse como similar a “anticuerpo anti-IGF-1R” y significa un anticuerpo capaz de unirse a IGF-1R.

En un ejemplo específico, el epítopo del anticuerpo se localiza en el dominio extracelular de IGF-1R de humano (al que se hace referencia asimismo como IGF-1R ECD).

Preferentemente, el anticuerpo o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene capacidad de unirse a IGF-1R con una EC_{50} comprendido entre $10x10^{-10}$ a $1x10^{-10}$, y más preferentemente entre $8x10^{-10}$ a $2x10^{-10}$M.

En este sentido, “EC_{50}” se refiere a la concentración efectiva del 50%. Más exactamente el término la mitad de concentración efectiva máxima (EC_{50}) corresponde a la concentración de un fármaco, anticuerpo o compuesto tóxico que induce una respuesta a medias entre el período inicial y máximo después de algún tiempo de exposición especificado. Comúnmente se usa como una medida de la potencia del fármaco. La EC_{50} de una curva de la respuesta a la dosis clasificada por lo tanto representa la concentración de un compuesto donde el 50% de su efecto máximo se observa. La EC_{50} de una curva de la respuesta a la dosis cuántica representa la concentración de un compuesto donde el 50% de la población muestra respuesta, después de la duración de exposición especificada. Las medidas de concentración por lo común siguen una curva sigmoidea, aumentando rápidamente sobre un cambio relativamente pequeño en la concentración. Esto puede determinarse matemáticamente por la derivación de la línea de ajuste mejor.

Preferentemente, la EC_{50} determinada caracterizó la potencia de unión del anticuerpo en el IGF-1R ECD expuesto en células tumorales de humano. El parámetro EC_{50} se determina mediante la utilización del análisis de FACS. El parámetro EC_{50} refleja la concentración del anticuerpo para la cual el 50% de la unión máxima en IGF-1R de humano expresado en células tumorales de humano se obtiene. Cada valor de EC_{50} se calculó como el punto medio de la curva de la respuesta a la dosis utilizando un programa de ajuste de la curva de la regresión de cuatro parámetros (Prism Software). Este parámetro se ha seleccionado para ser representativo de estados fisiológicos/patológicos.

El término "epítopo" es una región de un antígeno que es ligado por una proteína de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítopos estructurales y presentan aquellos residuos que directamente contribuyen a la afinidad de la interacción. Los epítopos también pueden ser estructurales, es decir compuestos por aminoácidos no lineales, los epítopos en otras palabras los epítopos estructurales están compuestos por aminoácidos no secuenciales. En ciertas formas de realización, los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tal como aminoácidos, cadenas secundarias de azúcar, grupos fosforilo, o grupos del sulfonilo, y, en ciertas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de la carga específicas.

Se proporciona asimismo un método para seleccionar un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R) y se internaliza siguiendo a su unión a IGF-1R, comprendiendo dicho método la etapa de seleccionar un anticuerpo:

i) que se une con un IGF-1R de SEC ID nº 52, y

ii) que no se une con un IGF-1R de SEC ID nº 52 con un aminoácido distinto a histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52 o con un ácido aspártico (ASP) en la posición 491, preferentemente que no se une con un IGF-1R de SEC ID nº 52 con un aminoácido distinto a histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52 y ácido aspártico (ASP) en la posición 491.

Se proporciona asimismo un método para seleccionar un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R) y se internaliza siguiendo a su unión a IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:

1) seleccionar un anticuerpo:

i) que se una con un IGF-1R de SEC ID nº 52, y

ii) que no se una con un IGF-1R de SEC ID nº 52 con un aminoácido distinto a histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52, o con un ácido aspártico (ASP) en la posición 491, preferentemente que no se une con un IGF-1R de SEC ID nº 52 con un aminoácido distinto a histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52 y ácido aspártico (ASP) en la posición 491,

y, a continuación, de tal anticuerpo,

2) seleccionar un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R del mismo, cuyo porcentaje de internalización siguiendo a su unión a IGF-1R es por lo menos del 40%, preferentemente por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70% o por lo menos el 80%.

Se proporciona asimismo un método para seleccionar un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R) y se internaliza siguiendo a su unión a IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:

1) seleccionar un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R del mismo, cuyo porcentaje de internalización siguiendo a su unión a IGF-1R es por lo menos del 40%, preferentemente por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70% o por lo menos el 80%,

2) y, a continuación, de tal anticuerpo, seleccionar un anticuerpo:

i) que se una con un IGF-1R de SEC ID nº 52, y

ii) que no se una con un IGF-1R de SEC ID nº 52 con un aminoácido distinto de la histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52, o con un ácido aspártico (ASP) en la posición 491, preferentemente que no se une con un IGF-1R de SEC ID nº 52 con un aminoácido distinto a histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52 y ácido aspártico (ASP) en la posición 491.

En un método descrito anteriormente, la etapa de seleccionar un anticuerpo en cuanto a sus características de internalización y unión, o no unión, a IGF-1R puede llevarse a cabo en cualquier orden sucesivo.

Específicamente, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R), tal como el obtenido por uno de los métodos citados anteriores.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R) de SEC ID nº 52 y se internaliza siguiendo a su unión a IGF-1R, y que no se une con un IGF-1R de SEC ID nº 82 o 92, preferentemente SEC ID nº 82 y 92.

Para un anticuerpo divulgado en la presente memoria, SEC ID nº 52 corresponde a la secuencia de aminoácidos del receptor IGF-1R de humano, en donde se encuentra una histidina en la posición 494, es decir IGF-1R natural, mientras que SEC ID nº 82 corresponde a la secuencia de aminoácidos mutada del receptor IGF-1R de humano, en donde se encuentra arginina en la posición 494, y mientras que SEC ID nº 92 corresponde a la secuencia de aminoácidos mutada del receptor IGF-1R de humano, en donde se encuentra una alanina en la posición 491.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido del ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en

donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 y el aminoácido del ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos, en donde dicho epítopo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en:

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 487 al aminoácido en la posición 494 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 488 al aminoácido en la posición 495 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 489 al aminoácido en la posición 496 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 490 al aminoácido en la posición 497 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 491 al aminoácido en la posición 498 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 492 al aminoácido en la posición 499 de SEC ID nº 52, y
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 493 al aminoácido en la posición 500 de SEC ID nº 52.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido del ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido del ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos, en donde dicho epítopo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en:

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 484 al aminoácido en la posición 491 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 485 al aminoácido en la posición 492 de SEC ID nº 52,
- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 486 al aminoácido en la posición 493 de SEC ID nº 52,

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 487 al aminoácido en la posición 494 de SEC ID nº 52,

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 488 al aminoácido en la posición 495 de SEC ID nº 52,

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 489 al aminoácido en la posición 496 de SEC ID nº 52, y

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 490 al aminoácido en la posición 497 de SEC ID nº 52.

Específicamente, se describe un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 y el ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 y el ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, con el epítopo mencionado que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos, en donde dicho epítopo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en:

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 487 al aminoácido en la posición 494 de SEC ID nº 52,

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 488 al aminoácido en la posición 495 de SEC ID nº 52,

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 489 al aminoácido en la posición 496 de SEC ID nº 52,

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 490 al aminoácido en la posición 497 de SEC ID nº 52 y

- una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que exhibe la identidad de por lo menos el 80% con, la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 491 al aminoácido en la posición 498 de SEC ID nº 52.

Se describe asimismo un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R) de SEC ID nº 52 y se internaliza a continuación de su unión a IGF-1R, y que no se une con un IGF-1R de SEC ID nº 82, o en donde el epítopo del anticuerpo internalizante mencionado comprende el aminoácido de histidina en la posición 494 y/o el aminoácido del ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52, en donde el porcentaje de la internalización del mencionado anticuerpo siguiente a su unión a IGF-1R es de por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70% o por lo menos el 80%. El porcentaje de la internalización de un anticuerpo, o de un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede determinarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, tal como, por ejemplo, un método descrito en la presente memoria.

Preferentemente**,** dicho aminoácido diferente de la histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52 que se describe anteriormente es arginina (SEC ID nº 82).

Preferentemente, dicho aminoácido diferente del ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52 que se describe anteriormente es alanina (SEC ID nº 92)

Se describe en la presente memoria un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina de humano (IGF-1R) y que se interioriza siguiendo a su unión a IGF-1R, y en el que dicho anticuerpo se selecciona de entre:

i) un anticuerpo que comprende tres CDR de cadena pesada con la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 y CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3, y tres CDR de cadena ligera con CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5;

ii) un anticuerpo que compite por unirse a IGF-1R con el anticuerpo de i); y

iii) un anticuerpo que se une con el mismo epítopo de IGF-1R como hace el anticuerpo de i).

La competencia para unirse a IGF-1R puede determinarse mediante cualquier método o métodos conocidos por el experto en la materia tal como, sin limitación, radiactividad, Biacore, ELISA, citometría de flujo, etc., o según un método tal como se describe en la presente memoria.

La determinación de la unión al mismo epítopo puede determinarse mediante cualquier método o técnicas conocidos por el experto en la materia tal como, sin limitación, radiactividad, Biacore, ELISA, citometría de flujo, etc., o según un método tal como se describe en la presente memoria.

Como se ha mencionado anteriormente, y al contrario del conocimiento general, la presente divulgación se concentra en anticuerpos IGF-1R específicos que presentan una elevada capacidad para interiorizarse siguiendo a la unión de IGF-1R. Como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo que “se interioriza” o que es “interiorizado” (las dos expresiones son similares) es el que que es aceptado por (significando que “entra”) la célula que mediante unión a IGF-1R en una célula de mamífero. Tal anticuerpo es interesante como uno de los componentes de inmuno-fármaco-conjugado, por tanto envía o dirige el citotóxico unido a las células diana, preferentemente células neoplásicas. Una vez interiorizado el citotóxico activa la muerte de célula cancerosa.

Preferentemente, los anticuerpos descritos en la presente memoria están en su totalidad presentando las mismas secuencias para CDR-H2, CDR-H3 y CDR-L2, siendo las otras 3 CDR diferentes. Esta observación parece coherente ya que es parte del conocimiento general que, en cuanto a la especificidad de unión de un anticuerpo, la CDR-H3 se describe como la más importante y la más implicada en el reconocimiento del epítopo.

Se piensa que las claves importantes para el éxito con el tratamiento del inmunoconjugado son la especificidad del antígeno diana y la internalización de los complejos de la proteína de unión del antígeno en células neoplásicas. Los antígenos obviamente no internalizantes son menos efectivos que los antígenos internalizantes para administrar agentes citotóxicos. Los procesos de la internalización son variables a través de antígenos y dependen de múltiples parámetros que pueden estar influidos por los anticuerpos.

En el inmunoconjugado, el citotóxico lleva la actividad citotóxica y el anticuerpo usado lleva su especificidad contra células neoplásicas, así como un vector para entrar dentro de las células para dirigirse correctamente al citotóxico. Así, para mejorar el inmunoconjugado, el anticuerpo puede mostrar la elevada capacidad de interiorizar en células neoplásicas dianizadas. La eficacia con la cual el anticuerpo reguló la internalización se diferencia considerablemente según el epítopo dianizado. La selección de potentes anticuerpos IGF-1R internalizantes requiere diversos datos experimentales que estudien no sólo la regulación por disminución de IGF-1R sino también siguiendo la internalización del anticuerpo IGF-1R en las células.

En una forma de realización, la internalización del anticuerpo que se describe en la presente memoria puede ser evaluada por inmunofluorescencia (como se ejemplifica a continuación en la presente solicitud) o cualquier método o proceso conocido por el experto en la materia específico para el mecanismo de la internalización.

El complejo IGF-1R/anticuerpo se interioriza después de la unión del anticuerpo al ECD de dicho IGF-1R, se induce una reducción de la cantidad de IGF-1R a la superficie de las células. Esta reducción puede cuantificarse por cualquier método conocido por el experto en la materia tal como, como ejemplos no limitativos, transferencia western, FACS, inmunofluorescencia y similar.

En una forma de realización, esta reducción, reflejando por lo tanto la internalización, puede ser preferentemente cuantificada por FACS y expresarse como la diferencia o delta entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) cuantificada a 4°C con la MFI cuantificada a 37°C después de incubación de 4 horas con el anticuerpo.

Como ejemplo no limitativo, este delta se determina sobre la base de MFI obtenida con células no tratadas y células sometidas a tratamiento con el anticuerpo utilizando i) células del cáncer de mama MCF7 después de un período de incubación de 4 horas con el anticuerpo descrito en la presente memoria y ii) un anticuerpo secundario marcado por Alexa488. Este parámetro se define como es calculado con la siguiente fórmula: Δ ($MFI_{4°C}$-$MFI_{37°C}$).

Esta diferencia entre MFI refleja la regulación por disminución de IGF-1R ya que MFI son proporcionales de IGF-1R expresado en la superficie celular.

En un aspecto ventajoso, los anticuerpos o cualquier fragmento de unión al antígeno de los mismos, consisten en

anticuerpos monoclonales que activan un Δ ($MFI_{4°C}$-$MFI_{37°C}$) en MCF7 de por lo menos 280, preferentemente de por lo menos 400.

Con mayor detalle, el delta anteriormente mencionado puede medirse según proceso siguiente, que debe considerarse como un ejemplo ilustrativo y no limitativo:

a) El tratamiento y la incubación de células tumorales de interés con el anticuerpo descrito en la presente memoria en frío (4°C) o caliente (37°C) completan el medio de cultivo;

b) El tratamiento de las células tratadas de la etapa a) y, en paralelo, células no tratadas con un anticuerpo secundario,

c) Medición de la MFI (representativa de la cantidad de IGF-1R presente en la superficie) para las células tratadas y no tratadas con un anticuerpo marcado secundario capaz de unirse al anticuerpo descrito anteriormente, y

d) Cálculo del delta como la sustracción de la MFI obtenida con las células tratadas de la MFI obtenida con las células no tratadas.

De este delta MFI, un porcentaje de la internalización puede determinarse como:

$100x(MFI_{4°C}-MFI_{37°C}) / MFI_{4°C}$

Los anticuerpos o cualquier fragmento de unión al antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria, presentan sobre MCF7 un porcentaje de internalización comprendido entre el 70% y el 90%, preferentemente entre el 75% y el 87%.

Una ventaja particular de los anticuerpos descritos en la presente memoria se basa en su tasa de internalización.

Es conocido generalmente que, para un inmunoconjugado, se desea que los anticuerpos usados muestren una rápida tasa de internalización, preferentemente dentro de 24 horas desde la administración del anticuerpo *in vivo* y, más preferentemente dentro de 12 horas e incluso más preferentemente dentro de 6 horas.

Como se describe en la presente memoria, la tasa de la internalización, a la que se hace referencia asimismo como disminución de anticuerpo ligado de la superficie celular o extinción del anticuerpo de la superficie celular, se expresa como t1/2 (vida media) y corresponde como el período de tiempo necesario para obtener una disminución del 50% del ΔMFI (este aspecto claramente se entenderá con respecto a los siguientes ejemplos).

Una ventaja particular consiste en que los presentes anticuerpos presentan una t1/2 comprendida entre 5 y 25 minutos, y preferentemente entre 10 y 20 minutos.

Una forma de realización particular de la divulgación se refiere a un anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6.

Una forma de realización es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las tres CDR de cadena pesada que comprenden, o que consisten en, las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3, o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 1, 2 y 3; y las tres CDR de cadena ligera que comprenden o que consisten en las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6, o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 4, 5 y 6.

En otra forma de realización, el anticuerpo o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende las tres CDR de cadena pesada que comprenden o que consisten en las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3; y las tres CDR de cadena ligera que comprenden o que consisten en las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6.

Por regiones de CDR o CDR(s), se pretende indicar las hiperregiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas como se ha definido por IMGT.

La numeración exclusiva de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables sea cual sea el receptor del antígeno, el tipo de cadena o las especies [Lefranc, M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M, Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Touvenin-Contet, V y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la enumeración exclusiva de IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma ubicación, por ejemplo cisteína 23 (1er-CYS), triptófano 41 (CONSERVADO-TRP), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2do-CYS), fenilananina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La enumeración exclusiva IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones estructurales

(FR1-IMGT: ubicaciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como las separaciones representan ubicaciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (que se muestra entre paréntesis y con separación por puntos, por ejemplo [8.8.13]) resultan una información crucial. La enumeración exclusiva de IMGT se usa en representaciones gráficas 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras en 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Debe apreciarse que, sin especificación contradictoria en la presente memoria, las regiones determinantes de complementariedad o CDR, significan las hiperregiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas como se ha definido según el sistema de numeración de IMGT.

Sin embargo, las CDR también pueden definirse según el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Department of Health and Human Services, NIH, 1991, y ediciones posteriores). Existen tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera. En la presente memoria, los términos “CDR” y “CDRs” se utilizan para indicar, dependiendo del caso, una o más, o incluso todas, de las regiones que contienen la mayoría de los residuos aminoacídicos responsables de la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno o epítopo que reconoce. A fin de simplificar la lectura de la presente solicitud, las CDR según Kabat no se definen. Sin embargo, sería obvio para un experto en la materia, utilizar la definición de las CDR según IMGT, para definir las CDR según Kabat.

Como se utiliza en la presente memoria, la “identidad del porcentaje” entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos idénticos o residuos aminoacídicos entre las dos secuencias que deben compararse, obtenido después de la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias distribuyéndose aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos ácido nucleicos o secuencias de aminoácidos es tradicionalmente llevada a cabo comparando las secuencias después haberlas alineado óptimamente, siendo dicha comparación capaz de llevarse a cabo por el segmento o utilizando una “ventana de alineación”. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de la comparación a mano, por medio del algoritmo de la homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de la homología local de Neddleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], por medio del método de búsqueda similar de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] o por medio de software que utiliza estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por el software de comparación BLAST NR o BLAST P).

La identidad del porcentaje entre dos ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos se determina al comparar las dos secuencias óptimamente alineadas en las cuales el ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos que deben compararse pueden presentar adiciones o eliminaciones en comparación con la secuencia de referencia para la alineación óptima entre las dos secuencias. La identidad del porcentaje se calcula determinando la cantidad de ubicaciones en las que el nucleótido aminoacídico o el residuo son idénticos entre las dos secuencias, preferentemente entre las dos secuencias completas, dividiendo la cantidad de ubicaciones idénticas por la cantidad total de ubicaciones en la ventana de alineación y multiplicando el resultado por 100 para obtener la identidad del porcentaje entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, “BLAST 2 sequences” (Tatusova et al., “Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250) disponible en el sitio http://www .ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html, puede usarse con los parámetros preestablecidos (particularmente para los parámetros “open gap penalty”: 5, y “extensión gap penalty”: 2; la matriz seleccionada es, por ejemplo, la matriz de “BLOSUM 62” propuesta por el programa); la identidad del porcentaje entre las dos secuencias que deben compararse se calcula directamente por el programa.

Para la secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen los que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, particularmente una eliminación, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos son sustituidos por aminoácidos “equivalentes”. En la presente memoria, la expresión “aminoácidos equivalentes” significa indicar cualquier aminoácido que es probable que se sustituya por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar sin embargo las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de aquellos ejemplos específicos definidos a continuación.

Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse en su homología estructural con los aminoácidos para los cuales se sustituyen o en los resultados de pruebas comparativas de la actividad biológica entre diversas proteínas de unión del antígeno que es probable que se generen.

Como un ejemplo no limitativo, la tabla 1 a continuación resume las posibles sustituciones que es probable que se lleven a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica de la proteína de unión del antígeno modificada correspondiente; las sustituciones inversas son naturalmente posibles en las mismas condiciones.

Tabla 1

Residuo original	Sustitución(es)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

El presente anticuerpo o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, no se une con el receptor de insulina (IR). Este aspecto es de interés ya que el anticuerpo descrito en la presente memoria no tendrá impacto negativo en el IR, significando el metabolismo de la insulina.

Otro aspecto ventajoso del presente anticuerpo es que presenta capacidad de unirse no sólo a IGF-1R de humano sino también a IGF-1R de mono, y más particularmente a IGF-1R de cinomolgo. Este aspecto también es de interés ya que facilitará la toxicidad y los ensayos clínicos.

En otra forma de realización, el anticuerpo consiste en un anticuerpo monoclonal.

El término "anticuerpo monoclonal" o "Mab", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales de la población son idénticos excepto posibles mutaciones de origen natural que pueden encontrarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un epítopo individual. Tal anticuerpo monoclonal puede producirse por un clon individual de linfocitos B o hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser recombinantes, es decir producidos por la ingeniería de proteínas. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de genotecas de anticuerpo de fago. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes o epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un epítopo individual del antígeno. El presente anticuerpo es aislado u obtenido por la purificación de fuentes naturales u obtenido por recombinación genética o síntesis química.

En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal en la presente memoria incluye el anticuerpo de murino, quimérico y humanizado, tal como se describe a continuación.

El anticuerpo puede derivarse de un hibridoma de origen murino presentado dentro de la colección francesa para cultivos del microorganismo (CNCM, Pasteur Institute, París, Francia), siendo dicho hibridoma obtenido por la fusión de los esplenocitos/linfocitos de ratones inmunizados Balb/C y las células de la línea celular de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

En otra forma de realización, el anticuerpo de la invención consiste en un anticuerpo recombinante. El término “anticuerpo recombinante” se refiere a un anticuerpo que resulta a partir de la expresión de ADN recombinante dentro de células vivas. Un anticuerpo recombinante se obtiene utilizando métodos de laboratorio de recombinación genética, conocidos por un experto en la materia, creando secuencias del ADN que no se encontrarían en organismos biológicos.

En otra forma de realización, el anticuerpo consiste en un anticuerpo sintetizado químicamente.

En una forma de realización, el anticuerpo IGF-1R consiste en un anticuerpo de murino, al que se hace referencia a continuación como m [*nombre del anticuerpo*].

En una forma de realización, el anticuerpo IGF-1R consiste en un anticuerpo quimérico, al que se hace referencia a continuación como c [*nombre del anticuerpo*].

En una forma de realización, el anticuerpo IGF-1R consiste en un anticuerpo humanizado, al que se hace referencia a continuación como hz [*nombre del anticuerpo*].

Para evitar la duda, las expresiones “anticuerpo IGF-1R” y “[*nombre del anticuerpo]*” son similares e incluyen (sin la especificación contraria) las versiones de murino, quimérica y humanizada de dicho anticuerpo IGF-1R y dicho “[*nombre del anticuerpo]*”. Cuando sea necesario, se utiliza el prefijo m- (murino), c- (quimérico) o hz- (humanizado).

En otra forma de realización, el anticuerpo selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11;

b) un anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 10, 5 y 11;

c) un anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 12; y

d) un anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 8, 2 y 3 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11.

Para más claridad, la siguiente tabla 2 ilustra las secuencias de la CDR, definidas según IMGT, para los anticuerpos preferidos.

Tabla 2

	Cadena pesada	**Cadena ligera**	**SEC ID nº**
Consenso	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5
		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 y 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9

	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

Resultará obvio para el experto en la materia que cualquier combinación de las 6 CDR como se describe anteriormente debería considerarse divulgada en la presente memoria.

Como puede apreciarse a partir de esta tabla 2, todos los anticuerpos descritos en la tabla presentan las mismas secuencias para la CDR-H2, CDR-H3 y CDR-L2, siendo esta propiedad de particular interés como se ha descrito anteriormente.

Un aspecto específico se refiere a un anticuerpo murino (m) o cualesquier fragmentos de unión al antígeno, caracterizado por que dicho anticuerpo también comprende regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga con el ratón, particularmente el hombre.

Otro aspecto específico se refiere a un anticuerpo (c) quimérico o cualesquier fragmentos de unión al antígeno, caracterizado por que dicho anticuerpo también comprende regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga con el ratón, particularmente humano.

Más específicamente, el anticuerpo consiste en un anticuerpo quimérico.

Un anticuerpo quimérico es el que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) derivada de un anticuerpo de una especie determinada en combinación con regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dichas especies determinadas.

Los anticuerpos o fragmentos quiméricos del mismo, pueden prepararse utilizando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico podría producirse clonando el ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano, particularmente murino y una secuencia que codifica la región constante del anticuerpo de humano. Un anticuerpo quimérico codificado por un tal gen recombinante podría ser, por ejemplo, una quimera de ratón y de humano, siendo la especificidad de este anticuerpo determinada mediante la región variable derivada del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano.

En una preferida, pero no limitativa, forma de realización, el anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 13 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con respecto a SEC ID nº 13 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11;

b) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 14 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 14 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 10, 5 y 11;

c) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 15 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 15 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 12;

d) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 16 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 16 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11; y

e) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 17 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 17 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 12.

Por “cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 13 a 17”, se pretende designar, respectivamente, una secuencia que muestra las tres CDR de cadena pesada SEC ID nº 1, 2 y 3 y, además, muestra por lo menos una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98%, con la secuencia completa SEC ID nº 13 a 17 fuera de las secuencias correspondiente a las CDR (es decir SEC ID nº 1, 2 y 3), en el que “fuera de las secuencias correspondientes a las CDR” está destinada a “exceptuar las secuencias correspondientes a las CDR”.

En otra preferida, pero no limitativa, forma de realización, el anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 18 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID

nº 18 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3;

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 19 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 19 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3;

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 20 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 20 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3;

d) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 21 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 21 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 8, 2 y 3; y

e) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 22 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 22 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3.

Por “cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 18 a 22”, se pretende designar las secuencias que muestran las tres CDR de cadena ligera SEC ID nº 4, 5 y 6 y, además, muestran una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98%, con la secuencia completa SEC ID nº 18 a 22 fuera de las secuencias correspondientes a las CDR (es decir SEC ID nº 4, 5 y 6).

Preferentemente, el anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 13 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 13 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 18 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 18;

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 14 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 14 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 19 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID Nº 19;

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 15 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 15 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 20 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 20;

d) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 16 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 16 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 21 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 21; y

e) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 17 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 17 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 22 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 22.

Los anticuerpos quiméricos descritos en la presente memoria pueden también ser caracterizados por el dominio constante y, más particularmente, dichos anticuerpos quiméricos pueden seleccionarse o diseñarse tal como, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD o IgE. Más preferentemente, **dichos** anticuerpos quiméricos son IgG1 o IgG4.

Preferentemente, dicho anticuerpo quimérico comprende dominios variables VH y VL como se describe anteriormente en el formato IgG1. Más preferentemente, dicho anticuerpo quimérico comprende un dominio constante para el VH de la secuencia SEC ID nº 43 y un dominio de Kappa para el VL de la secuencia SEC ID nº 45.

Alternativamente, dicho anticuerpo quimérico comprende dominios variables VH y VL como se ha descrito anteriormente en el formato IgG4. Más preferentemente, dicho anticuerpo quimérico comprende un dominio constante para el VH de la secuencia SEC ID nº 44 y un dominio de Kappa para el VL de la secuencia SEC ID nº 45.

Preferentemente, el anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 23 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 23 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 28 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 28;

b) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 24 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 24 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 29 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 29;

c) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 25 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 25 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 30 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 30;

d) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 26 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 26 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 31or cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 31; y

e) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 27 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 27 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 32 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 32.

Para más claridad, la siguiente tabla 3 ilustra las secuencias del VH y VL, respectivamente, para los anticuerpos quiméricos preferidos.

Tabla 3

	Cadena pesada	**Cadena ligera**	**SEC ID nº**
c208F2	Dominio variable (VH)		13
		Dominio variable (VL)	18
	Cadena completa		23
		Cadena completa	28
c212A11	Dominio variable (VH)		14
		Dominio variable (VL)	19
	Cadena completa		24
		Cadena completa	29
c214F8	Dominio variable (VH)		15
		Dominio variable (VL)	20
	Cadena completa		25
		Cadena completa	30
c219D6	Dominio variable (VH)		16
		Dominio variable (VL)	21
	Cadena completa		26
		Cadena completa	31
c213B10	Dominio variable (VH)		17
		Dominio variable (VL)	22
	Cadena completa		27
		Cadena completa	32

Aún otro aspecto específico de los presentes anticuerpos se refiere a un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, caracterizado por que las regiones constantes de cadena ligera y la cadena pesada derivadas del anticuerpo de humano son, respectivamente, región lambda o kappa y la región gamma 1, gamma 2 o gamma 4.

Específicamente, el presente anticuerpo consiste en un anticuerpo humanizado.

“Los anticuerpos humanizados” significan un anticuerpo que contiene regiones de CDR derivadas de un anticuerpo del origen no humano, siendo las otras partes de la molécula del anticuerpo derivadas de un (o varios) anticuerpo(s) de humano. Además, algunos residuos de segmento del esqueleto (denominados FR) pueden modificarse para conservar la afinidad de unión.

Los anticuerpos humanizados o los fragmentos de los mismos pueden prepararse por métodos conocidos por un experto en la materia. Tales anticuerpos humanizados se prefieren para su uso en métodos que implican diagnósticos *in vitro* o tratamiento preventivo y/o terapéutico *in vivo*. Otras técnicas de la humanización, también conocidas por un experto en la materia, tal como, por ejemplo, "injerto de CDR" técnica descrita por PDL en las patentes EP 0 451 216, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US nº 5.530.101, US nº 6.180.370, US nº 5.585.089 y US nº 5.693.761. Las patentes US nº 5.639.641 o 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293 también pueden citarse.

Específicamente, y como se explicará con mayor detalle en los siguientes ejemplos, en la presente memoria se describe un anticuerpo que consiste en el hz208F2. Tal humanización también puede aplicarse a la otra parte de anticuerpos de la presente divulgación.

En una forma de realización preferida, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que presenta:

i) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3, respectivamente,

ii) FR1, FR2 y FR3 que derivan de la línea germinal de humano IGHV1-46*01 (SEC ID nº 46), y

iii) FR4 que deriva de la línea germinal de humano IGHJ4*01 (SEC ID nº 48).

En una forma de realización preferida, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que presenta:

i) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11, respectivamente,

ii) FR1, FR2 y FR3 que derivan de la línea germinal de humano IGKV1-39*01 (SEC ID nº 47), y

iii) FR4 que deriva de la línea germinal de humano IGKJ4*01 (SEC ID nº 49).

Preferentemente, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena pesada que presenta CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3, respectivamente, y FR1, FR2 y FR3 que derivan de la línea germinal de humano IGHV1-46*01 (SEC ID nº 46), y FR4 que deriva de la línea germinal de humano IGHJ4*01 (SEC ID nº 48); y

b) una cadena ligera que presenta CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11, respectivamente, y FR1, FR2 y FR3 que derivan de la línea germinal de humano IGKV1-39*01 (SEC ID nº 47), y FR4 que deriva de la línea germinal de humano IGKJ4*01 (SEC ID nº 49).

En una forma de realización, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia SEC ID nº 33 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de la secuencia SEC ID nº 35. Dicho anticuerpo humanizado se llamará en lo sucesivo hz208F2 ("Variante" o "Var". 1).

En otra forma de realización, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia SEC ID nº 33 en el que dicha secuencia SEC ID nº 33 comprende por lo menos 1 retromutación seleccionada de entre los residuos 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 y 95.

Mediante las expresiones "retromutación" o "mutación inversa" se hace referencia a una mutación o el reemplazo del presente residuo humano en la línea germinal por el residuo correspondiente inicialmente presente en la secuencia de murino.

En otra forma de realización, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia SEC ID nº 33 en el que dicha secuencia SEC ID nº 33 comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 retromutaciones seleccionadas de entre los residuos 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 y 95.

Para más claridad, la siguiente tabla 4 ilustra las retromutaciones preferidas.

Tabla 4

Aminoácido Núm.	20	34	35	38	48	50	59	61
Murino	M	I	Y	K	L	W	K	N
Humano	V	M	H	R	M	I	S	A

Aminoácido Núm.	62	70	72	74	76	77	79	82	95
Murino	E	L	A	K	S	N	A	F	F
Humano	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

En una forma de realización, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de la secuencia SEC ID nº 35, en el que dicha secuencia SEC ID nº 35 comprende por lo menos 1 retromutación seleccionada de entre los residuos 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 y 87.

En una forma de realización, el presente anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de la secuencia SEC ID nº 35, en el que dicha secuencia SEC ID nº 35 comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 retromutaciones seleccionadas de entre los residuos 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 y 87.

En otra forma de realización, el presente anticuerpo comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia SEC ID nº 33 en el que dicha secuencia SEC ID nº 33 comprende por lo menos 1 retromutación seleccionada de entre los residuos 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 y 95; y

b) un dominio variable de cadena ligera (VL) de la secuencia SEC ID nº 35, en el que dicha secuencia SEC ID nº 35 comprende por lo menos 1 retromutación seleccionada de entre los residuos 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 y 87.

Para más claridad, la siguiente tabla 5 ilustra las retromutaciones preferidas.

Tabla 5

Aminoácido Núm.	22	53	55	65	71	72	77	87
Murino	S	R	H	R	Y	S	N	F
Humano	T	S	Q	S	F	T	S	Y

En tal forma de realización, dicho anticuerpo comprende todas las retromutaciones anteriormente mencionadas y corresponde a un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia SEC ID nº 34 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de la secuencia SEC ID nº 36. El anticuerpo humanizado mencionado se llamará en adelante hz208F2 (“Variante” o “Var”. 3).

En otra forma de realización, todas las formas humanizadas comprendidas entre las variante 1 y variante 3 también son comprendidas por la presente invención. Es decir, el presente anticuerpo corresponde a un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de la secuencia de “consenso” SEC ID nº 41 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de la secuencia de “consenso” SEC ID nº 42. Dicho anticuerpo humanizado, en conjunto, se llamará en adelante hz208F2 (“Variante” o “Var”. 2).

En una forma de realización preferida pero no limitativa, el presente anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 33 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 33 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11;

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 34 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 34 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 80; y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11.

Mediante “cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 33, 34, 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80”, se pretenden designar las secuencias que muestran las tres CDR de cadena pesada SEC ID nº 1, 2 y 3 y, además, muestran una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98%, con la secuencia completa SEC ID nº 33,34, 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 80 fuera de las secuencias correspondientes a las CDR (es decir SEC ID nº 1, 2 y 3).

En una forma de realización, preferida, pero no limitativa, el presente anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 35 o

cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 35 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3; y

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 36 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 36 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 57 y 60 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 57 o 60; y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3.

Mediante “cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 35, 36, 57 o 60”, se pretenden designar las secuencias que muestran las tres CDR de cadena ligera SEC ID nº 4, 5 y 6 y, además, muestran una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98%, con la secuencia completa SEC ID nº 35,36, 57 o 60 fuera de las secuencias correspondientes a las CDR (es decir SEC ID nº 4, 5 y 6).

Los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria pueden también ser caracterizados por el dominio constante y, más particularmente, dichos anticuerpos humanizados pueden seleccionarse o diseñarse tal como, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD o IgE. Más preferentemente, dichos anticuerpos humanizados son IgG1 o IgG4.

Preferentemente, dicho anticuerpo humanizado comprende dominios variables VH y VL como se describe anteriormente en el formato IgG1. Más preferentemente, dicho anticuerpo humanizado comprende un dominio constante para el VH de la secuencia SEC ID nº 43 y un dominio de Kappa para el VL de la secuencia SEC ID nº 45.

Alternativamente, dicho anticuerpo humanizado comprende dominios variables VH y VL como se describe anteriormente en el formato IgG4. Más preferentemente, dicho anticuerpo humanizado comprende un dominio constante para el VH de la secuencia SEC ID nº 44 y un dominio de Kappa para el VL de la secuencia SEC ID nº 45.

Preferentemente, dicho anticuerpo es seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 37 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 37 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 39 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 39;

b) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 38 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 38 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 40 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 40; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 57 60 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 57 o 60.

Para más claridad, la siguiente tabla 6a ilustra ejemplos no limitativos de las secuencias del VH y VL para la variante 1 (Var. 1) y variante 3 (Var. 3) del anticuerpo humanizado hz208F2. También comprende la secuencia de consenso para la variante 2 (Var. 2).

Tabla 6a

	Cadena pesada	**Cadena ligera**	**SEC ID nº**
hz208F2 (var. 1)	Dominio variable (VH)		33
		Dominio variable (VL)	35
	Cadena completa		37
		Cadena completa	39
hz208F2 (Var. 3)	Dominio variable (VH)		34
		Dominio variable (VL)	36
	Cadena completa		38
		Cadena completa	40

	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
hz208F2 (Var. 2)	Dominio variable (VH)		41
		Dominio variable (VL)	42

En otra forma de realización preferida, pero no limitativa, el presente anticuerpo se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80; y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11;

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 57 and60 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 57 o 60; y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 57 and60 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 57 o 60; y un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80.

Preferentemente, el presente anticuerpo es seleccionado de entre un anticuerpo que comprende o que consiste en:

a) una cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 y 81 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 o 81; y

b) una cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 59 y 61 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% o 98% con SEC ID nº 59 o 61.

Preferentemente, el presente anticuerpo es seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80; y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 57 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 57; y

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 64, 68 y 78 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 56, 64, 68 o 78 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 60 o cualquier secuencia que muestra por lo menos un 80% de identidad con respecto a SEC ID nº 60

Preferentemente, el presente anticuerpo es seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 58 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 58 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

b) un anticuerpo que comprende o que consiste en una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 58 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 58 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 61 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 61;

c) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 63 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 63 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

d) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 65 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 65 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

e) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 65 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 65 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 61 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 61;

f) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 67 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 67 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

g) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 69 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 69 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

h) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 69 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 69 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 61 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 61;

i) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 71 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 71 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

j) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 73 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 73 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

k) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 75 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 75 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

l) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 77 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 77 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

m) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 79 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 79 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59;

n) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 79 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 79 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 61 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 61; y

o) un anticuerpo que comprende, o que consiste en, una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 81 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 81 y una cadena ligera que comprende, o que consiste en, secuencia SEC ID nº 59 o cualquier secuencia que muestra una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% con SEC ID nº 59.

Para más claridad, la siguiente tabla 6b ilustra ejemplos no limitativos de las secuencias del VH y VL (dominio variable y toda la longitud) para diferentes variantes del anticuerpo humanizado hz208F2.

Tabla 6b

	Cadena pesada	**Cadena ligera**	**SEC ID Nº**
hz208F2 H037/L018	Dominio variable (VH)	Dominio variable (VL)	56 57
	Cadena completa	Cadena completa	58 59

	Cadena pesada	**Cadena ligera**	**SEC ID Nº**
	Dominio variable (VH)		56
Hz208F2		Dominio variable (VL)	60
H037/L021	Cadena completa		58
		Cadena completa	61
	Dominio variable (VH)		62
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H047/L018	Cadena completa		63
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		64
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H049/L018	Cadena completa		65
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		64
Hz208F2		Dominio variable (VL)	60
H049/L021	Cadena completa		65
		Cadena completa	61
	Dominio variable (VH)		66
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H051/L018	Cadena completa		67
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		68
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H052/L018	Cadena completa		69
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		68
Hz208F2		Dominio variable (VL)	60
H052/L021	Cadena completa		69
		Cadena completa	61
	Dominio variable (VH)		70
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H057/L018	Cadena completa		71
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		72
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H068/L018	Cadena completa		73
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		74
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H070/L018	Cadena completa		75
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		76
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H071/L018	Cadena completa		77
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		78
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H076/L018	Cadena completa		79
		Cadena completa	59
	Dominio variable (VH)		78
Hz208F2		Dominio variable (VL)	60
H076/L021	Cadena completa		79
		Cadena completa	61
	Dominio variable (VH)		80
Hz208F2		Dominio variable (VL)	57
H077/L018	Cadena completa		81
		Cadena completa	59

Preferentemente, el presente anticuerpo es seleccionado de entre:

i) un anticuerpo producido por el hibridoma I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 o I-4774 depositado en la CNCM, Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia el 30 de mayo de 2013, el 26 de junio de 2013, el 26 de junio de 2013, el 24 de abril de 2013 y el 26 de junio de 2013, respectivamente,

ii) un anticuerpo que compite por unirse a IGF-1R con el anticuerpo de i); y

iii) un anticuerpo que se une con el mismo epítopo de IGF-1R como el anticuerpo de i).

Se proporciona asimismo un hibridoma murino, en el que dicho hibridoma es seleccionado de entre hibridoma I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 e I-4774 depositados en la CNCM, Institut Pasteur Francia el 30 de mayo de 2013, el 26 de junio de 2013, el 26 de junio de 2013, el 24 de abril de 2013 y el 26 de junio de 2013, respectivamente.

Un nuevo aspecto de la presente descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, divulgado en la presente memoria.

Los términos “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “secuencia de ácido nucleico”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia polinucleotídica” y “secuencia nucleotídica”, utilizados de modo indistinto en la presente memoria, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, definiendo un fragmento o una región de un ácido nucleico, conteniendo nucleótidos no naturales o no, y es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o los productos de transcripción de dichos ADN.

Las presentes secuencias se han aislado y/o se han purificado, es decir, fueron muestreadas directa o indirectamente, por ejemplo por una copia, su ambiente ha sido por lo menos parcialmente modificado. Los ácidos nucleicos aislados obtenidos por técnicas de recombinación genética, por medio, por ejemplo, de células hospedadoras, u obtenidos por la síntesis química también deberían mencionarse en la presente memoria. Se proporciona asimismo en la presente memoria un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se divulga en la presente memoria.

La divulgación particularmente se dirige a los vectores de clonación y/o expresión que contienen tal secuencia nucleotídica.

Los vectores preferentemente contienen elementos que permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias nucleotídicas en una célula hospedadora determinada. El vector así debe contener un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como regiones de regulación de transcripción adecuadas. Debe ser capaz de mantenerse de una manera estable en la célula hospedadora y puede tener opcionalmente señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos se seleccionan y optimizan por un experto en la materia según la célula hospedadora usada. Para este fin, las secuencias nucleotídicas pueden insertarse en vectores autorreplicantes dentro del hospedador seleccionado o ser vectores integrantes del hospedador seleccionado.

Tales vectores se preparan por métodos utilizados típicamente por un experto en la materia y los clones resultantes pueden introducirse en un hospedador adecuado por métodos convencionales como lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos.

Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen plásmido o viral. Se utilizan para transformar células hospedadoras para clonar o expresar las secuencias nucleotídicas descritas anteriormente.

La divulgación también se refiere a células hospedadoras aisladas transformadas por o que comprenden un vector como se describe anteriormente.

La célula hospedadora puede seleccionarse de entre sistemas procarióticos o eucarióticos como células bacterianas, por ejemplo, pero también células de la levadura o células de animal, particularmente células de mamífero (a excepción de humano). Las células vegetales o de insecto también pueden utilizarse.

La divulgación se refiere asimismo a animales, además del humano, que presentan una célula transformada.

Otro aspecto se refiere a un método para la producción de un anticuerpo divulgado en la presente memoria o un fragmento de unión al antígeno del mismo, caracterizado por que dicho método comprende las etapas siguientes:

a) el cultivo en un medio con las condiciones de cultivo adecuadas para una célula hospedadora descrita anteriormente; y

b) la recuperación del anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, producidos así a partir del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

Las células transformadas son de utilización en métodos para la preparación de anticuerpos recombinantes descritos en la presente memoria. Los métodos para la preparación de anticuerpos en forma recombinante que utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector como se describe en la presente memoria, también están comprendidos en la presente memoria. Preferentemente, una célula transformada por un vector como se describe anteriormente se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión del anticuerpo anteriormente mencionado y la recuperación de dicho

anticuerpo.

Como se ha mencionado anteriormente, la célula hospedadora puede seleccionarse de entre sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar las secuencias nucleotídicas que facilitan la secreción en tal sistema procariótico o eucariótico. Un vector que transporta tal secuencia puede usarse así ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes que deben secretarse. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés será facilitada por el hecho de que se encuentran presentes en el sobrenadante del cultivo celular más que dentro de las células hospedadoras.

El anticuerpo también puede prepararse por síntesis química. Tal método de preparación también es un objeto de la divulgación. Un experto en la materia conoce métodos para la síntesis química, tal como métodos en fase sólida o métodos en fase sólida parciales, por la condensación de fragmentos o por la síntesis convencional en solución. Los polipéptidos obtenidos mediante síntesis química y capaces de contener aminoácidos no naturales correspondientes también están comprendidos en la divulgación.

El anticuerpo o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, que probablemente se obtengan por el método anteriormente descrito también está comprendido en la presente divulgación.

Específicamente, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe anteriormente para utilizarse como un vehículo de direccionamiento para administrar un agente citotóxico a un sitio diana hospedador, consistiendo dicho sitio diana hospedador en un epítopo localizado en IGF-1R, preferentemente el dominio extracelular IGF-1R, más preferentemente IGF-1R de humano (SEC ID nº 50) y todavía más preferentemente el dominio extracelular IGF-1R de humano (SEC ID nº 51), y todavía más preferentemente al extremo N del dominio extracelular IGF-1R de humano (SEC ID nº 52), o cualquier secuencia variante natural del mismo.

En una forma de realización preferida, dicho sitio diana hospedador es un sitio diana de una célula de mamífero, más preferentemente de una célula humana, más preferentemente células que naturalmente o por vía de la recombinación genética, expresan IGF-1R.

Se proporciona asimismo en la presente memoria un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe anteriormente, conjugado a un agente citotóxico.

Dicho inmunoconjugado comprende el anticuerpo como se describe en la presente memoria conjugado a un agente citotóxico.

Las expresiones “inmunoconjugado” o “inmuno-conjugado” se refieren generalmente a un compuesto que comprende por lo menos un producto de direccionamiento, tal como un anticuerpo, físicamente unido con un uno o más agente(s) terapéutico(s), creando así un compuesto elevadamente dirigido.

En una forma de realización preferida, tales agentes terapéuticos consisten en agentes citotóxicos.

Por “agente citotóxico” o “citotóxico”, se propone un agente que, cuando es administrado a un sujeto, trata o evita el desarrollo de proliferación celular anormal, preferentemente el desarrollo del cáncer en el cuerpo del sujeto, al inhibir o evitar una función celular y/o causar la muerte celular.

Muchos agentes citotóxicos se han aislado o se han sintetizado y posibilitan inhibir la proliferación de células, o destruir o reducir, si no definitivamente, por lo menos considerablemente las células tumorales. Sin embargo, la actividad tóxica de estos agentes no se limita a las células tumorales, y las células no tumorales también son afectadas y pueden destruirse. Más particularmente, los efectos secundarios se observan en renovar rápidamente células, como células hematopoyéticas o células del epitelio, particularmente de las membranas mucosas. A título ilustrativo, las células del sistema digestivo son en gran parte afectadas por la utilización de tales agentes citotóxicos.

Uno de los objetivos de la presente divulgación también es ser capaz de proporcionar un agente citotóxico que posibilita limitar los efectos secundarios en células normales al conservar al mismo tiempo una elevada citotoxicidad en células tumorales.

Más particularmente, el agente citotóxico puede consistir preferentemente, sin limitación, en un fármaco (es decir “conjugado anticuerpo-fármaco”), una toxina (es decir “inmunotoxina” o “conjugado anticuerpo-toxina”), un radioisótopo (es decir “radioimmunoconjugado” o “conjugado del radioisótopo del anticuerpo”), etc.

En una primera forma de realización preferida, el inmunoconjugado consiste en un anticuerpo unido con por lo menos un fármaco o un medicamento. Se hace referencia a dicho inmunoconjugado como un conjugado anticuerpo-fármaco (o “ADC”).

En una primera forma de realización, tales fármacos pueden describirse en cuanto a su modo de la acción. Como ejemplo no limitativo, pueden mencionarse agentes alquilantes como mostaza de nitrógeno, alquil-sulfonatos, nitrosourea, oxazoforinas, aziridinas o etilenos de la imina, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores de función de cromatina, agentes de antiangiogénesis, antiestrógenos, antiandrógenos, agentes quelantes, estimulante de absorción de hierro, inhibidores de ciclooxigenasa, inhibidores de la fosfodiesterasa, inhibidores del ADN, inhibidores de ADN sintéticos, estimulantes de apoptosis, inhibidores de timidilato, inhibidores del linfocito T, agonistas del Interferón, inhibidores de la reductasa del trifosfato ribonucleósido, inhibidores de aromatasa, antagonistas del receptor del estrógeno, inhibidores de la tirosina cinasa, inhibidores del ciclo celular, taxano, inhibidores de la tubulina, inhibidores de la angiogénesis, estimulantes del macrófago, antagonistas del receptor de neurocinina, agonistas del receptor canabinoide, agonistas del receptor de dopamina, agonistas del factor estimulante de granulocitos, agonistas del receptor de eritropoyetina, agonistas del receptor de somatostatina, los agonistas de LHRH, los sensibilizadores de calcio, los antagonistas del receptor de VEGF, los antagonistas del receptor de interleucina, los inhibidores del osteoclasto, los estimulantes de formación de radicales, los antagonistas del receptor de endotelina, el alcaloide de vinca, la antihormona o los fármacos inmunorreguladores o cualquier otro nuevo fármaco que realice los criterios de actividad de un citotóxico o una toxina.

Tales fármacos, por ejemplo, se citan en VIDAL 2010, en la página dedicada a los compuestos unidos a cancerología y columna de hematología “citotóxica”, estos compuestos citotóxicos citados en cuanto a este documento se citan en la presente memoria como agentes citotóxicos preferidos.

Más particularmente, sin limitación, se prefieren los siguientes fármacos o medicamentos según la invención: mecloratamina, clorambucol, melfalén, clorhidrato, pipobromén, prednimustina, disodic-fosfato, estramustina, ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida, ifosfamida, tiotepa, trietilenamina, altetramina, carmustina, estreptozocina, fotemustina, lomustina, busulfán, treosulfán, improsulfán, dacarbazina, platino de CEI, oxaliplatino, lobaplatino, heptaplatino, miriplatino hidrato, carboplatino, metotrexato, pemetrexed, 5-fluoruracilo, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citarabina, 6-mercaptopurina (6 MP), nelarabina, 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, deoxicoformicina, tegafur, pentostatina, doxorrubicina, daunorrubicina, idarrubicina, valrrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina, procarbacina, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, topotecano, irinotecano, etopósido, valrrubicina, amrrubicina clorhidrato, pirarrubicina, acetato de eliptinio, zorrubicina, epirrubicina, idarrubicina y tenipósido, razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginona, CNEL 3, neovastat, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón alfa, EMD121974, interleucina 12, IM862, angiostatina, tamoxifino, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozol, letrozol, exemestano, flutamida, nilutamida, espironolactona, acetato de ciproterona, finasterida, cimitidina, bortezomida, Velcade, bicalutamida, ciproterona, flutamida, fulvestrán, exemestano, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib, retinoide, rexinoide, metoxsaleno, metilaminolevulinato, aldesleucina, denileucina diflitox, interleucina 2, tasonermina, lentinan, sizofilán, roquinimex, pidotimod, pegademaso, timopentina, poli I:C, procodazol, Tico BCG, corynebacterio parvum, ucraína, levamisol, 1311-cTNT, H-101, celmoleucina, interferón alfa2a, interferón alfa2b, interferón gamma1a, interleucina 2, mobena, Rexin-G, teceleucina, aclarrubicina, actinomicina, arglabina, asparaginasa, carzinofilina, cromomicina, daunomicina, leucovorina, masoprocol, neocarzinostatina, peplomicina, sarkomicina, solamargina, trabectedina, estreptozocina, testosterona, kunecatequinas, sinecatequinas, alitretinoína, belotecán clorhidrato, calusterona, dromostanolona, acetato de eliptinio, etinilestradiol, etopósido, fluoximesterona, formestano, fosfetrol, acetato de la goserelina, hexilo aminolevulinato, histrelina, hidroxiprogesterona, ixabepilona, leuprólido, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megesterol, metilprednisolona, metiltestosterona, miltefosina, mitobronitol, nadrolona fenilpropionato, acetato de noretisterona, prednisolona, prednisona, temsirolimus, testolactona, triamconolona, triptorelina, vapreotida acetato, cinostatina estimalamero, amsacrina, trióxido de arsénico, bisantreno clorhidrato, clorambucilo, clortrianiseno, CEI-diamminedicloroplatinio, ciclofosfamida, dietilstilbestrol, hexametilmelamina, hidroxiurea, lenalidomida, lonidamina, mecloretanamina, mitotano, nedaplatino, nimustina clorhidrato, pamidronato, pipobromano, porfímero de sodio, ranimustina, razoxano, semustina, sobuzoxano, mesilato, trietilenemelamina, ácido zoledronico, camostat mesilato, fadrozol HCl, nafoxidina, aminoglutetimida, carmofur, clofarabina, citarabina, decitabina, doxifluridina, enocitabina, fludarabno fosfato, fluorouracilo, ftorafur, mostaza uracilo, abarelix, bexaroteno, raltiterxed, tamibaroteno, temozolomida, vorinostat, megastrol, clodronato disódico, levamisol, ferumoxitol, hierro isomaltósido, celecoxib, ibudilast, bendamustina, altretamina, mitolactol, temsirolimo, pralatrexato, TS-1, decitabina, bicalutamida, flutamida, letrozol, clodronato disódico, degarelix, toremifeno citrato, diclorhidrato de histamina, DW-166HC, nitracrina, decitabina, clorhidrato del irinotecano, amsacrina, romidepsina, tretinoina, cabazitaxel, vandetanib, lenalidomida, ácido ibandrónico, miltefosina, vitespeno, mifamurtida, nadroparina, granisetrón, ondansetrón, tropisetrón, alizaprida, ramosetrón, dolasetrón mesilato, fosaprepitant dimeglumina, nabilona, aprepitant, dronabinol, TY-10721, lisurida maleato de hidrógeno, epiceram, defibrotida, dabigatran etexilato, filgrastima, pegfilgrastim, reditux, epoetina, molgramostim, oprelvekin, sipuleucel-T, M Vax, L-carnitina de acetilo, clorhidrato de donepecilo, ácido 5-aminolevulínico, metil-aminolevulinato, acetato de cetrorelix, icodextrina, leuprorelina, metbilfenidato, octreotido, amlexanox, plerixafor, menatetrenona, anetol ditioletiona, doxercalciferol, cinacalcet clorhidrato, alefacept, romiplostim, timoglobulina, timalfasin, ubenimex, imiquimod, everolimus, sirolimus, H-101, lasofoxifeno, trilostano, incadronato, gangliósidos, pegaptanib octasodio,

vertoporfina, ácido minodrónico, ácido zoledronico, nitrato de galio, alendronato sódico, etidronato disódico, pamidronato disódico, , dutasterida, sodio estibogluconato, armodafinila, dexrazoxano, amifostina, WF-10, temoporfina, alfa-darbepoetina, ancestima, sargramostima, palifermina, R-744, nepidermina, oprelvecina, denileucina diftitox, crisantaspasa, buserelina, deslorelina, lanreotida, octreótido, pilocarpina, bosentano, caliqueamicina, maitansinoides, ciclonicato y pirrolobenzodiacepinas, particularmente los descritos en la solicitud PCT publicada bajo el documento número WO2011/130598.

En otra forma de realización, el inmunoconjugado consiste en un anticuerpo unido con por lo menos un radioisótopo. Tal inmunoconjugado se refiere como un conjugado del radioisótopo del anticuerpo (o “ARC”).

Para la destrucción selectiva de tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo muy radiactivo. Una variedad de isótopos radiactivos está disponible para la producción de ARC tal como, sin limitación, At^{211}, C^{13}, N^{15}, O^{17}, Fl^{19}, I^{123}, I^{131}, I^{125}, In^{111}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, tc99 m, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, isótopos radiactivos de Lu, gadolinio, manganeso o hierro.

Cualquier método o procesos conocidos por el experto en la materia poderse usar para incorporar tal radioisótopo al ARC. Como ejemplo no limitativo, tc99 m o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e O In^{111} puede fijarse mediante un residuo de la cisteína. Y^{90} puede fijarse mediante un residuo de la lisina. I^{123} puede fijarse al usar el método IODOGEN.

Varios ejemplos pueden mencionarse para ilustrar el conocimiento del experto en la materia en el campo del ARC como Zevalin$^{EI\ ®}$ que es un ARC compuesto por un anticuerpo monoclonal anti-CD20 y radioisótopo In^{111} o Y^{90} ligado por un quelante ligador de tiourea; o Mylotarg$^{EI\ ®}$ que está compuesto por un anticuerpo anti-CD33 unido a la caliqueamicina, (patentes US nº 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Más recientemente, también puede mencionarse el ADC referido como Adcetris (correspondiente a Brentuximab vedotin) que ha sido recientemente aceptado por la FDA en el tratamiento del linfoma de Hodgkin.

En otra forma de realización, el inmunoconjugado consiste en un anticuerpo unido con por lo menos una toxina. Se hace referencia a dicho inmunoconjugado como un conjugado toxina-anticuerpo (o “ATC”).

Las toxinas son efectivas y venenos específicos producidos por organismos vivos. Por lo general consisten en una cadena aminoacídica que puede variar en el peso molecular entre un par de cientos (péptidos) y cien mil (proteínas). También pueden ser compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Las toxinas se producen por diversos organismos, por ejemplo, bacterias, hongos, algas y vegetales. Muchos de ellos son muy venenosos, con una toxicidad que es de varios órdenes de magnitud mayores que los agentes nerviosos.

Las toxinas usadas en ATC pueden incluir, sin limitación, toda la clase de toxinas que pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen unión de la tubulina, unión del ADN o inhibición de la topoisomerasa.

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que puede usarse incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPsS), inhibidor de *Momordica carantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos.

Las toxinas de molécula pequeña, como dolastatinas, auristatinas, particularmente la monometilauristatina E (MMAE), un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que presentan la actividad de toxina, también son contempladas en la presente memoria. Las dolastatinas y auristatinas han mostrado interferir con la dinámica del microtúbulo, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular y tener actividad contra el cáncer y antifúngica.

“Ligador", "unidad ligadora" o "enlace" significa una porción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a por lo menos un agente citotóxico.

Los ligadores pueden elaborarse utilizando una variedad de agentes de acoplamiento proteínicos bifuncionales como el n-succinimidil-3-propionato (2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), los derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetilo adipimidato HCl), ésteres activos (como el disuccinimidil suberato), aldehídos (como el glutaraldehído), compuestos del bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil)hexanediamina), bis-diazonio derivados (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como el tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis activos (como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen-triamin-pentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplificante para la conjugación de agentes citotóxicos al sistema con especificidad de objetivo. Otros reactivos del agente de reticulación pueden ser BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MB, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MB, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-benzoato (4-vinilsulfona)) que se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., EE.UU.).

El ligador puede ser “no escindible” o “escindible”.

En una forma de realización preferida, consiste en un "ligador escindible” que falicita la liberación del agente citotóxico en la célula. Por ejemplo, se pueden utilizar un ligador ácido lábil, el ligador sensible a la peptidasa, el ligador fotolábil, el ligador del dimetilo o el ligador que contiene disulfuro. El ligador es, en una forma de realización preferida, escindible en condiciones intracelulares, tales como la escisión del ligador libera el agente citotóxico del anticuerpo en el ambiente intracelular.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, el ligador es escindible por un agente de escisión que se encuentra en el ambiente intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El ligador puede ser, por ejemplo, un ligador del peptidilo que es escindido por una peptidasa intracelular o enzima de la proteasa, incluyendo, entre otros, una proteasa lisosómica o endosómica. Por lo común, el ligador del peptidilo es por lo menos de dos aminoácidos de longitud o por lo menos de tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, de los cuales todos se conoce que hidrolizan derivados del fármaco del dipéptido dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana. Por ejemplo, un ligador del peptidilo que es escindible por catepsina-B de la proteasa dependiente del tiol, que se expresa de manera elevada en el tejido canceroso, puede usarse (por ejemplo, un Phe-Leu o un ligador Gly-Phe-Leu-Gly). En formas de realización específicas, el ligador del peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un ligador de Val-Cit o un ligador Phe-Lys. Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente citotóxico consiste en que el agente típicamente se atenúa cuando es conjugado y la estabilidad sérica de los conjugados es típicamente elevada.

En otras formas de realización, el ligador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores del pH. Típicamente, el ligador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, un ligador ácido lábil que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetalo, cetal, o similares) puede usarse. Tales ligadores son relativamente estables en condiciones del pH neutras, como las de la sangre, pero son inestables or debajo de pH 5.5 o 5.0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas formas de realización, el ligador hidrolizable es un ligador de tioéter (tal como, por ejemplo, tioéter unido al agente terapéutico mediante una unión acilhidrazona.

Incluso en otras formas de realización, el ligador es escindible bajo condiciones de reducción (por ejemplo, un ligador del disulfuro). Una variedad de ligadores del disulfuro se conocen en la técnica, incluso, por ejemplo, aquellos que pueden formarse al usar SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio))butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2 piridil-ditio)tolueno)-, SPDB y SMPT.

Como ejemplo no limitativo de ligadores no escindibles o “no reductibles”, puede mencionarse el trastuzumab-DM1 de inmunoconjugado (TDM1) que combina el trastuzumab con un agente quimioterapéutico unido, maitansina.

En una forma de realización preferida, el inmunoconjugado puede prepararse por cualquier método conocido por el experto en la materia tal como, sin limitación, i) la reacción de un grupo nucleófilo del anticuerpo con un reactivo ligador bivalente seguido de la reacción con el agente citotóxico o ii) la reacción de un grupo nucleófilo de un agente citotóxico con un reactivo ligador bivalente seguido de la reacción con el grupo nucleófilo del anticuerpo.

Los grupos nucleófilos en el anticuerpo incluyen, sin limitación, grupos de amina N-terminales, grupos de amina de cadena secundaria, por ejemplo lisina, grupos de tiol de cadena secundaria, e hidroxilo de azúcar o grupos amino cuando la proteína de unión del antígeno está glucosilada. La amina, el tiol y los grupos del hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en porciones ligadoras y reactivos ligadores incluso, sin limitación, ésteres activos como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; alquilo y haluros de bencilo como haloacetamidas; aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. El anticuerpo puede tener disulfuros intercatenarios reducibles, es decir puentes de la cisteína. El anticuerpo puede elaborarse reactivo para la conjugación con reactivos ligadores por el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitol). Cada puente de la cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos del tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en el anticuerpo a través de cualquier reacción conocida por el experto en la materia. Como ejemplo no limitativo, los grupos del tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo al introducirse uno o más residuos de la cisteína.

Los inmunoconjugados también pueden producirse por la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrófilas, que pueden reaccionar con sustitutos nucleófilos en el reactivo ligador o agente citotóxico. Los azúcares del anticuerpo glucosilado pueden oxidarse para formar aldehído o grupos de la cetona que pueden reaccionar con el grupo de la amina de reactivos ligadores o agente citotóxico. La imina resultante los grupos de la base de Schiff pueden formar un enlace estable o pueden reducirse para formar enlaces de la amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o con meta-periodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo que puede reaccionar con grupos adecuados en el fármaco. En otra forma de realización, los anticuerpos que contienen

serina N-terminal o residuos de la treonina pueden reaccionar con el meta-periodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en vez del primer aminoácido.

En ciertas formas de realización preferidas, la unidad ligadora puede presentar la siguiente fórmula general:

-- Ta -- Ww -- Yy--

en la:

-T- es una unidad de ensanchador;

a es 0 o 1;

-W- es una unidad aminoacídica;

w es independientemente un número comprendido entre 1 y 12;

-Y- es una unidad de separación;

y es 0, 1 o 2.

La unidad de ensanchador (-T-), cuando está presente, une el anticuerpo a una unidad aminoacídica (-W-). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes sobre el anticuerpo, naturalmente o por manipulación química, incluyen sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo del hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. Los grupos de sulfhidrilo pueden generarse por la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares del anticuerpo, si se encuentran presentes. Alternativamente, los grupos de sulfhidrilo pueden generarse por la reacción de un grupo amino de una porción de la lisina del anticuerpo con 2-iminotiolano u otros reactivos de generación de sulfhidrilo. En formas de realización específicas, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante y se manipula genéticamente para transportar una o más lisinas. Más preferentemente, el anticuerpo puede manipularse genéticamente para transportar una o más cisteínas (cf. ThioMabs).

En ciertas formas de realización específicas, la unidad de ensanchador forma un enlace con un átomo de azufre del anticuerpo. El átomo de azufre puede derivarse de un grupo sulfhidrilo (--SH) de un anticuerpo reducido.

En ciertas otras formas de realización específicas, la unidad ensanachadora se une al anticuerpo mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre del anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad de ensanchador.

En otras formas de realización específicas, el grupo reactivo del ensanchador contiene un sitio reactivo que puede ser reactivo a un grupo amino del anticuerpo. El grupo amino puede ser el de arginina o una lisina. Los sitios de amina reactivos adecuados incluyen, sin limitación, ésteres activados como ésteres de succinimida, ésteres 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros del sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos.

Incluso en otro aspecto, la función reactiva del ensanchador contiene un sitio reactivo que es reactivo a un grupo de carbohidrato modificado que puede estar presente sobre el anticuerpo. En una forma de realización específica, el anticuerpo está glucosilado enzimáticamente para proporcionar una porción de carbohidrato. El carbohidrato puede suavemente oxidarse con un reactivo como el periodato de sodio y la unidad de carbonilo resultante del carbohidrato oxidado puede condensarse con un ensanchador que contiene una funcionalidad como hidrazida, una oxima, una amina reactiva, hidracina, tiosemicarbazida, un carboxilato de hidracina o arilhidrazida.

La unidad aminoacídica (-W-) une la unidad de ensanchador (-T-) a la unidad de separación (-Y-) si la unidad de separación se encuentra y une la unidad de ensanchador al agente citotóxico si la unidad de separación está ausente.

Como se menciona anteriormente, -Ww- puede ser un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o unidad de dodecapéptido

En algunas formas de realización, la unidad aminoacídica puede comprender residuos aminoacídicos tal como, sin limitación, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilananina, triptófano, prolina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con tosilo o grupos del nitro, histidina, ornitina, ornitina protegida con acetilo o formilo y citrulina. Los componentes ligadores aminoacídicos ejemplificantes incluyen preferentemente un dipéptido, un tripéptido, tetrapéptido o un pentapéptido.

Los dipéptidos ejemplificantes incluyen: Val-Cit, Ala-Val, Ala-Ala, Val-Ala, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9 tosilo-Arg, Phe-N9-Nitro Arg.

Los tripéptidos ejemplificantes incluyen: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

El tetrapéptido ejemplificante incluye: Gly-Phe-Leu-Gly (SEC ID Nº 53), Ala-Leu-Ala-Leu (SEC ID Nº 54).

El pentapéptido ejemplificante incluye: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEC ID Nº 55).

Los residuos aminoacídicos que comprenden un componente ligador aminoacídico incluyen los que ocurren naturalmente, así como aminoácidos menores y análogos aminoacídicos que ocurren artificialmente, como la citrulina. Los componentes ligadores aminoacídicos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada por tumor, catepsina B, C y D o una proteasa de la plasmina.

La unidad aminoacídica del ligador puede ser enzimáticamente escindida por una enzima incluyendo, pero de manera no limitativa, una proteasa asociada a tumor para liberar al agente citotóxico.

La unidad aminoacídica puede diseñarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por una proteasa asociada a tumor particular. Las unidades adecuadas son aquellas cuya escisión es catalizada por las proteasas, catepsina B, C y D y plasmina.

La unidad de separación (-Y-), cuando está presente, une una unidad aminoacídica al agente citotóxico. Las unidades de separación son de dos tipos generales: autodestructivo y no autodestructivo. Una unidad de separación no autodestructiva es aquella en la que parte o toda la unidad de separación permanecen unidas al agente citotóxico después de la escisión enzimática de una unidad aminoacídica del inmunoconjugado. Los ejemplos de una unidad de separación no autodestructiva incluyen, sin limitación (glicina-glicina) unidad de separación y una unidad de separación de glicina. Para liberar al agente citotóxico, una reacción de la hidrólisis independiente debería ocurrir dentro de la célula diana para escindir la unión de la unidad glicina-fármaco.

En otra forma de realización, una no autodestructiva unidad de separación (-Y-) es -Gly-.

En una forma de realización, el inmunoconjugado carece de una unidad de separación (y=0). Alternativamente, un inmunoconjugado que contiene una unidad de separación autodestructiva puede liberar al agente citotóxico sin la necesidad de una etapa de la hidrólisis separada. En estas formas de realización, -Y- es unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) que se une a -Ww- mediante el átomo de nitrógeno del grupo PAB, y conecta directamente con -D mediante carbonato, carbamato o grupo éter.

Otros ejemplos de separadores autodestructivos incluyen, sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol y orto o para-aminobencilacetalos. Los separadores que pueden usarse experimentan la ciclación fácil mediante la hidrólisis de la unión de la amida, como amidas ácidas 4-aminobutíricas sustituidas y no sustituidas, apropiadamente sistemas de anillo de biciclo [2.2.1] y biciclo [2.2.2] sustituidos y amidas ácidas 2-aminofenllpropiónicas.

En una forma de realización alternativa, la unidad de separación es una unidad de bis(hidroximetilo)estireno ramificada (BHMS), que puede usar para incorporar agentes citotóxicos adicionales.

La carga de fármaco, referida asimismo como proporción de fármaco-anticuerpo (DAR) es el número promedio de fármacos PBD por agente de unión celular.

En caso de un isotipo de anticuerpo IgG1, donde los fármacos se unen con cisteínas después de la reducción del anticuerpo parcial, la carga del fármaco puede comprender desde 1 a 8 fármacos (D) por anticuerpo, es decir donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 porciones del fármaco se unen covalentemente al anticuerpo.

En caso de un isotipo de anticuerpo IgG2, donde los fármacos se unen con cisteínas después de la reducción del anticuerpo parcial, la carga del fármaco puede comprender desde 1 a 12 fármacos (D) por anticuerpo, es decir donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 porciones del fármaco se unen covalentemente al anticuerpo.

Las composiciones de ADC incluyen colecciones de agentes de unión celular, por ejemplo anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8 o 1 a 12.

Donde los fármacos se unen con lisinas, la carga del fármaco puede comprender desde 1 a 80 fármacos (D) por anticuerpo celular, aunque un límite superior de 40, 20, 10 o 8 pueda preferirse. Las composiciones de ADC incluyen colecciones de agentes de unión celular, por ejemplo anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 80, 1 a 40, 1 a 20, 1 a 10 o 1 a 8.

El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede

caracterizarse por medios convencionales. La distribución cuantitativa de ADC en términos de proporción del fármaco también puede determinarse. Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco, la proporción del fármaco puede ser limitada por la cantidad de sitios de la unión en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener sólo uno o varios grupos del tiol de la cisteína o puede tener sólo uno o varios grupos del tiol suficientemente reactivos a través de los cuales un ligador puede fijarse. La carga del fármaco más elevada, por ejemplo la proporción del fármaco> 5, puede causar la agregación, la insolubilidad, la toxicidad o la pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco.

Ciertos anticuerpos presentan disulfuros intercatenarios reducibles, es decir puentes de la cisteína. Los anticuerpos pueden elaborarse reactivos para la conjugación con reactivos ligadores por el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitol). Cada puente de la cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos del tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con el 2-iminotiolano (el reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos del tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) mediante genomanipulación de, dos, tres, cuatro, o más residuos de la cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos aminoacídicos de la cisteína no naturales). La patente US nº 7.521.541 muestra anticuerpos técnicos por la introducción de aminoácidos de la cisteína reactivos.

Los aminoácidos de la cisteína pueden manipularse genéticamente en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro intracatenarios o intermoleculares (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26 (8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114 (13):2721-2729; patentes US nº. 7521541; US nº. 7723485; documento WO2009/052249). Los tioles de la cisteína manipulados genéticamente pueden reaccionar con reactivos ligadores o los reactivos ligadores de fármaco que presentan grupos electrófilos, reactivos a tiol, tales como maleimida o alfa-halo amidas para formar ADC con anticuerpos genomanipulados de cisteína y las porciones del fármaco PBD. La ubicación de la porción del fármaco puede así diseñarse, controlarse y conocerse. La carga del fármaco puede controlarse ya que los grupos del tiol de la cisteína manipulados genéticamente típicamente reaccionan con reactivos ligadores reactivos a tiol o reactivos ligadores de fármaco en alto rendimiento. La ingeniería de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de la cisteína por la sustitución en un sitio individual en la cadena pesada o ligera proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Una carga de fármaco próxima a 2 puede lograrse con proximidad a la homogeneidad del producto de conjugación ADC.

Además, se proporciona en la presente memoria un inmunoconjugado o un conjugado anticuerpo-fármaco como se describe anteriormente para usarse como un medicamento.

También, se proporciona además un inmunoconjugado o un conjugado anticuerpo-fármaco como se describe anteriormente para la utilización en el tratamiento contra el cáncer.

Un conjugado anticuerpo-fármaco como se describe anteriormente se proporciona en la presente memoria para usarse como un medicamento. Específicamente, el conjugado anticuerpo-fármaco como se describe anteriormente se proporciona para la utilización en el tratamiento contra el cáncer. Más específicamente, el conjugado anticuerpo-fármaco como se describe anteriormente se proporciona para la utilización en el tratamiento de cáncer que expresa IGF-1R, o cánceres relacionados con IGF-1R.

Los cánceres relacionados con IGF-1R incluyen células tumorales que expresan o y sobreexpresan todo o parte del IGF-1R en su superficie.

Más particularmente, dichos cánceres son de mama, colon, carcinoma esofágico, hepatocelular, gástrico, glioma, pulmón, melanoma, osteosarcoma, ovárico, próstata, rabdomiosarcoma, renal, tiroides, cáncer endometrial uterino y cualquier fenómeno de resistencia a fármaco.

En otro aspecto, la utilización de un conjugado anticuerpo-fármaco divulgado anteriormente para el tratamiento contra un cáncer que expresa IGF-1R se proporciona en la presente memoria.

Otro objeto que se proporciona en la presente memoria es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un conjugado anticuerpo-fármaco o inmunoconjugado, como se describe anteriormente.

Más particularmente, se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un conjugado anticuerpo-fármaco o el inmunoconjugado anteriormente descrito y por lo menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Más preferentemente**,** la composición farmacéutica comprende el anticuerpo o el conjugado anticuerpo-fármaco anteriormente descrito, y por lo menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente” pretenden indicar un compuesto o una combinación de compuestos que ingresan en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del/de los

compuesto(s) activo(s), un aumento de su vida útil y/o de su eficacia en el cuerpo, un aumento de su solubilidad en la solución o una mejora de su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables y excipientes son conocidos y se adaptarán por el experto en la materia como una función de la naturaleza y del modo de administración del/de los compuesto(s) activo(s) seleccionado(s).

Preferentemente, estos inmunoconjugados se administrarán por la ruta sistémica, particularmente por la ruta intravenosa, por la ruta intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la ruta oral. En una manera más preferida, la composición que comprende los inmunoconjugados se administrarán varias veces, de una manera secuencial.

Sus modos de administración, dosis y formas farmacéuticas óptimas pueden determinarse según los criterios generalmente considerados en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente tal como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la seriedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios observados.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un conjugado anticuerpo-fármaco o el inmunoconjugado que se describen anteriormente y por lo menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable para la utilización en el tratamiento contra el cáncer. En un aspecto más particular, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un conjugado anticuerpo-fármaco o el inmunoconjugado que se describen anteriormente y por lo menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable para la utilización en el tratamiento contra un cáncer que expresa IGF-1R.

La divulgación se refiere asimismo a un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto, y particularmente para el tratamiento contra un cáncer que expresa IGF-1R, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de por lo menos un conjugado anticuerpo-fármaco descrito anteriormente. Además, la presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto, y particularmente para el tratamiento contra un cáncer que expresa IGF-1R, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que se describe anteriormente.

Otra forma de realización proporciona un método para administrar un fármaco o un medicamento a una célula neoplásica que expresa IGF-1R en un sujeto, que comprende administrar a dicho al sujeto una cantidad efectiva de por lo menos un conjugado anticuerpo-fármaco o una composición farmacéutica que se divulgan anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: ejemplo del perfil de unión Biacore obtenido con 3 anticuerpos en hIGF-1R ECD capturados por un anticuerpo anti-His-Tag.

Figura 2: esquema de mapeo del epítopo definido del panel de 15 anticuerpos monoclonales anti-hIGF-1R que se definen 5 grupos del epítopo. La numeración de los grupos no se une a una ubicación en cuanto a la secuencia, ni la estructura en 3D del antígeno.

Figuras 3A a 3C: unión del anticuerpo a IGF-1R de origen natural de humano mediante análisis FACS. La figura 3A representa la curva de la titulación, en la línea celular MCF-7, de un Ab anti-IGF-1R quimérico representativo para cada grupo de agrupación de epítopo. MFI representa la media de la intensidad fluorescente. La figura 3B representa la EC_{50} tanto de anticuerpos anti-IGF-1R quiméricos como murinos en la línea celular MCF-7. La figura 3C representa B_{max} de anticuerpos anti-IGF-1R quiméricos en la línea celular MCF-7.

Figuras 4A y 4B: evaluación de reconocimiento de hIGF-1R utilizando células no transfectadas contra células transfectadas. La figura 4A representa curvas de la titulación de un Ab anti-IGF-1R quimérico representativo de cada grupo de agrupamiento de epítopo en línea celular IGF-1R^{+}. MFI representa la media de la intensidad fluorescente. La figura 4B representa la unión de un Ab anti-IGF-1R quimérico representativo de cada grupo de agrupamiento de epítopo en una línea celular de IGF-1R de humano^{-}. MFI representa la media de la intensidad fluorescente

Figuras 5A y 5B: evaluación de la especificidad de Abs a hIGF-1R contra hIR al usar células transfectadas. La figura 5A representa la unión del Ab anti-IGF-1R del murino en línea celular transfectada hIR^{+}. La figura 5B representa la unión del Ab anti-IGF-1R quimérico en la línea celular IR +. MFI representa la media de la intensidad fluorescente. En el panel A y B el anticuerpo anti-hIR comercialmente disponible descrito como GRO5 (Calbiochem) se ha introducido como un control positivo.

Figura 6: unión de Ab anti-IGF-1R de murino en la línea celular IM-9. MFI representa la media de la intensidad fluorescente. Mab GRO5 anti-hIR se introdujo como un control positivo.

Figuras 7A, 7B y 7C: evaluación de reconocimiento de IGF-1R de mono. La figura 7A representa las curvas de la titulación de un Ab anti-IGF-1R quimérico representativo de cada grupo de agrupamiento de epítopo en la

línea celular COS-7. MFI representa la media de la intensidad fluorescente. La figura 7B representa la EC_{50} tanto de de anticuerpos anti-IGF-1R quiméricos como murinos en línea celular COS-7. La figura 7C representa el EC_{50} de anticuerpos anti-IGF-1R quiméricos en células transfectadas hIGF-1R$^+$ y células COS-7. El GR11L (Calbiochem) se introdujo como un control positivo.

Figura 8: comparación de unión de c208F2 en hIGF-1R ECD o IGF-1R ECD de mono cinomolgo al usar ensayo de Biacore. Los sensogramas obtenidos en una tecnología SPR a base de Biacore X100 utilizando CM5 sensorchip activado con más de 11000 RU de anticuerpo anti-Tag His de ratón químicamente injertado a la matriz del dextrano del carboximetilo. El experimento se ejecuta a velocidad de flujo de 30 µl/min a 25°C utilizando HBS-EP + como la serie y muestras que diluyen el amortiguador. La figura muestra la superposición de 4 sensogramas independientes alineados en el eje X al inicio de la primera inyección de los analitos y en el eje Y por el período inicial definido justo antes de esta primera inyección. Los sensogramas obtenidos con la captura de la secuencia basada en humano de IGF-1R soluble recombinante son marcados por diamantes. Los sensogramas obtenidos con la captura de la secuencia a base de cinomolgo de IGF-1R soluble recombinante son marcados por triángulos. Los símbolos blancos corresponden a los ciclos en blanco (5 inyecciones del amortiguador de la serie) y los símbolos negros corresponden a las inyecciones del intervalo de crecimiento de concentraciones de c208F2 (5, 10, 20, 40 y 80nM).

Figura 9: evaluación del efecto intrínseco de anticuerpos anti-hIGF-1R en fosforilación del receptor comparado con IGF1.

Figura 10: inhibición de fosforilación IGF-1R en respuesta a IGF-1 por anti-hIGF-1R murino.

Figura 11: unión de la superficie celular de anticuerpos anti-IGF-1R es regulada por disminución a 37°C. Las células de MCF-7 se incubaron a 4°C o 37°C durante 4 h con 10 µg/ml de cada Ab. La figura representa el ∆MFI.

Figuras 12A y 12B: deterioro de la superficie del anticuerpo. El anticuerpo ligado a la superficie celular se evaluó después 10, 20, 30, 60 y 120 minutos a 37°C. La figura 12A representa el % de IGF-1R restante en comparación con la intensidad de la señal cuantificada a 4°C. La figura 12B representa el cálculo de la vida media utilizando el software de Prims utilizando el ajuste de deterioro exponencial.

Figura 13: cinética de la internalización del anticuerpo evaluada mediante análisis FACS. Las células se incubaron con 10 µg/ml de ABs de murino durante 0, 30 o 60 minutos a 37°C. Las células eran permeabilizadas o no e incubaron con IgG-Alexa antirratón secundario 488. La membrana corresponde a la intensidad de la señal sin la permeabilización. El total corresponde a la intensidad de la señal después de que la permeabilización celular y citoplásmico corresponde a Ab interiorizado. El nombre de cada anticuerpo evaluado se representa en la parte superior de cada gráfico.

Figuras 14A y 14B: formación de imágenes de internalización de Ab. Figura 14A: las células de MCF-7 se incubaron con m208F2 durante 20 minutos a 4°C y lavado antes de la incubación [a)] a 37°C durante 15 [b)], 30 [c)] y 60 [d)] min. Las células se fijaron y permeabilizaron. M208F2 Ab se reveló al usar una IgG antirratón Alexa488 y Lamp-1 se reveló con un anticuerpo anti-Lamp-1 de conejo y con una IgG anticonejo secundaria Alexa 555. Figura 14B (parte I a III): las células de MCF-7 se incubaron durante 30 minutos a 37°C con cada uno del otro anticuerpo de murino anti-hIGF-1R para analizarse y luego tiñeron como se describe anteriormente. La colocalización se identificó al utilizando la colocalización el programa highliter del software Image J.

Figura 15: participación de la vía del lisosoma en la degradación del anticuerpo

Figura 16: evaluación de la unión de anticuerpos de murino anti-hIG-1R a diferente pH. La EC50 de la unión de los diferentes anticuerpos se evaluó en MCF-7 al usar el amortiguador con el diferente pH comprendido entre 5 y 8.

Figura 17: evaluación de la capacidad de los Ab anti-IGF-1R seleccionados para inducir citotoxicidad en ensayo de la Fab-ZAP. A) las células MCF-7 se incubaron con concentraciones cada vez mayores de los anticuerpos anti-IGF-1R quiméricos combinados con el kit de la Fab-ZAP de humano. La viabilidad celular se cuantificó al usar ensayo de viabilidad celular luminiscente. CellTiter-Glo®. El anticuerpo quimérico c9G4 se usó como el anticuerpo irrelevante. B) IC_{50}s de resultados representado en A).

Figura 18: correlación entre potencia citotóxica i), ii) influencia de pH en la unión Ab/IGF-1R, iii) efecto de Abs en fosforilación inducida por IGF-1 de IGF-1R y iv) agrupamiento de anticuerpo.

Figuras 19A a 19D: característica de unión de la primera forma humanizada de c208F2 Mab. Las propiedades de unión de hz208F2 VH3/VL3 mAb se evaluaron en la línea celular humana MCF-7 (figura 19A), en la línea celular COS-7 de mono (figura 19B) y en la línea celular de murino transfectada que expresa el receptor de insulina de humano (figura 19C). La unión tanto del murino como del quimérico 208F2 mAbs se evaluó en

paralelo. El clon de anticuerpo anti-hIR GRO5 se utilizó para verificar la expresión del hIR en la línea celular transfectada (figura 19D).

Figuras 20A a 20D: validación del de ELISA del anticuerpo policlonal AF305-NA que se ha usado para ensayos de IHC. figura 20A: Unión a hIGF-1R, figura 20B: Unión a IR recombinante de humano. Ningún reconocimiento de hIR EDC y de IR celular expresado por células transfectadas (figura 20D) comparado con Ab GRO5 de control en estas células transfectadas hIR (figura 20C).

Figura 21: validación de tinción de hIGF-1R en secciones de FFPE de xenoinjertos que expresan diversos niveles de hIGF-1R. Hs746T se introdujo como un control negativo

Figuras 22A y 22B: evaluación de expresión de hIGF-1R en secciones tisulares FFPE normales. Las secciones de la placenta se usaron como un control positivo para tejidos normales mientras que los tejidos de xenoinjerto tumorales positivos se introdujeron en cada serie para calibrar la expresión hIGF-1R.

Figura 23: evaluación de expresión hIGF-1R en secciones tisulares NSCL FFPE. Cuatro casos que son representativos para la tinción potente observada en el panel mayor del tejido analizado.

Figura 24: evaluación de expresión de hIGF-1R en secciones del tejido de FFPE de cáncer de mama. Tres casos que son representativos para la tinción potente observada en el panel analizado del tejido analizado.

Figura 25: evaluación de la expresión hIGF-1R en las secciones tisulares de FFPE de diversos tumores.

Figura 26: superposición de sensogramas obtenidos con un dispositivo a base de SPR Biacore X100 a una temperatura de 25°C con un circuito integrado de sensor CM5 activado en ambas celdas de flujo con aproximadamente 12.000 RU de unos anticuerpos monoclonales anti-TagHis de ratón químicamente injertados a la matriz de carboximetildextrano utilizando un HBS-EP+ como la amortiguación de la serie a una velocidad de flujo de 30 µl/min. Cada sensograma (el primero marcado por triángulos y el segundo marcado por diamantes) corresponde a un ciclo completo:

1. Inyección durante un minuto de una solución de e h-IGF-1R recombinante (10 µg/ml) en la segunda celda de flujo.

2. Para el primer sensograma: 5 inyecciones de amortiguador de la serie durante 90 s cada una

Para el segundo sensograma: cinco inyecciones en el intervalo creciente de concentraciones de las soluciones de anticuerpo anti-IGF-1R c208F2 durante 90 s cada una.

1. Un retraso de 300 s para la determinación de las tasas cinéticas de disociación.

2. Una regeneración de la superficie por una inyección durante 45 s de glicina de 10 mm, amortiguador de pH de 1.5 HCl.

Figura 27: El sensograma correspondiente a la sustracción del sensograma en blanco (5 inyecciones de HBS-EP +) al sensograma obtenido con el intervalo creciente de concentraciones de las soluciones anti-IGF-1R c208F2 se presenta en el gris. El sensograma teórico correspondiente al modelo 1:1 con los siguientes parámetros: k_{on} = (1.206 ± 0.036) x 106 M^{-} 1.s^{-1}, k_{off} = (7.81 ± 0.18) x 10^{-5} s^{-1}, Rmax = 307.6 ± 0.3 RU se presenta por una línea negra delgada. Las concentraciones calculadas de c208F2 se describen en el gráfico: sólo la concentración más elevada (24nM) se considera como una constante).

Figura 28: Las constantes de disociación corresponden a la media de los cuatro experimentos ejecutados para cada anticuerpo y corresponden a la proporción: k_{off}/k_{on} x 10^{12} que debe expresarse en unidad pM. Las barras de error corresponden al error estándar (n=4).

Figura 29: Las semividas corresponden a la media de los cuatro experimentos ejecutados para cada anticuerpo y corresponden a la proporción: Ln(2)/k_{off}/3600 que debe expresarse en la unidad h. Las barras de error corresponden al error estándar (n=4).

Figura 30: superubicación de dos sensogramas correspondiente a dos ciclos de un experimento que se ejecuta en un dispositivo Biacore X100 a velocidad de flujo de 30µl/min y a 25°C.

La primera etapa del ciclo corresponde la inyección de una solución del anticuerpo c208F2 a la concentración de 10 µg/ml durante 60 s en la segunda celda de flujo de un circuito integrado del sensor CM5 activado por el injerto de más de 10,500 RU de un anticuerpo monoclonal no humano de ratón IgG Fc enlazado químicamente a la matriz de carboximetildextrano por sus funciones de amina. La segunda etapa corresponde a la inyección del dominio extracelular de cualesquier soluciones de h-IGF-1R (diamantes sinples) o m-IGF-1R (diamantes

vacíos) de sobrenadantes de medio de células en bruto durante 120 s con un retraso de 120 s. Las dobles flechas con punta indican las ubicaciones de medición del nivel de captura del anticuerpo y el nivel de unión de IGF-1R usado en este estudio.

Figura 31: los histogramas que representan la proporción entre el nivel de unión de IGF-1R obtenido para cada constructo IGF-1R h/m quimérico y el nivel de c208F2 capturado en la segunda celda de flujo del sensorchip durante el ciclo correspondiente.

Figuras 32A y B: histogramas que representan la EC50 de hz208F2 H076/L024 para el pH 5 al pH 8, el pH ácido disminuye la capacidad de unión de los anticuerpos IGF-1R humanizados hz208F2 H076/L024 (A) y hz208F2 (H077/L018 (B).

Figuras 33: unión de Hz208F2 (10µg/ml) en 170 RU de origen natural de una versión soluble del h-IGF1R (diamante negro) o en 120 RU del mutante C29 (Asp491> Ala) de este receptor. Cada receptor se captura por su C-terminal 66His Tag en un circuito integrado de sensor CM5. El experimento se ejecutó con un dispositivo Biacore X100 a 25°C a velocidad de flujo de 30µl/min utilizando HBS-EP clásico + como amortiguador de ejecución.

Ejemplos

Todos los hibridomas mencionados en la presente memoria se han depositado en la CNCM (Institut Pasteur, Francia) y se identifican en la siguiente tabla 7.

Tabla 7

Nombre del hibridoma	Ref. CNCM	Fecha de presentación
101H8	I-4733	24 de abril de 2013
201F1	I-4769	26 de junio de 2013
208F2	I-4757	30 de mayo de 2013
212A11	I-4773	26 de junio de 2013
214F8	I-4775	26 de junio de 2013
219D6	I-4736	24 de abril de 2013
213B10	I-4774	26 de junio de 2013
102H8	I-4767	26 de junio de 2013
110G9	I-4768	26 de junio de 2013
415A8	I-4778	26 de junio de 2013
410G4	I-4777	26 de junio de 2013
414E1	I-4738	24 de abril de 2013
433H9	I-4780	26 de junio de 2013
105G2	I-4735	24 de abril de 2013
832E5	I-4765	30 de mayo de 2013

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos IGF-1R

Para generar anticuerpos monoclonales de murino (Mabs) contra el dominio extracelular de humano (ECD) del receptor IGF-1 de humano (hIGF-1R), 5 ratones BALB/c se inmunizaron 3 períodos de tiempo s.c. con 10 µg de la proteína rhIGF-1R (R&D Systems, Cat. N°391-GR). Como una alternativa, tres inmunizaciones adicionales con 10 µg del dominio extracelular de murino (ECD) de IGF-1R (R&D Systems, Cat. N°/Fc 6630-GR) se llevaron a cabo en algunos animales. La primera inmunización se llevó a cabo en la presencia de ddyuvante Freund completo (Sigma, St Louis, MD, USA). El adyuvante Freund incompleto (Sigma) se agregó para las siguientes inmunizaciones. Tres días antes de la fusión, los ratones inmunizados se estimularon con 10 µg de la proteína rhIGF-1R. Luego los esplenocitos y los linfocitos se prepararon por la perfusión del bazo y cortando los nódulos linfáticos proximales, respectivamente, se recogieron de 1 de los 5 ratones inmunizados (seleccionado después de la titulación de sueros de todos los ratones) y fusionaron a células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC, Rockville, MD, USA). El protocolo de la fusión se describe por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Las células fusionadas se someten luego a la selección por HAT. En términos generales, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, sobre todo de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen particularmente en el manual “Antibodies” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp 726, 1988). Aproximadamente 10 días después de la fusión, las colonias de células híbridas se cribaron. Para el cribado primario, los sobrenadantes de hibridomas se evaluaron para la secreción de Mabs elevada contra la proteína de rhIGF-1R ECD por el análisis FACS al usar el células tumorales de MCF7 de mama de humano (ATCC) y/o células de COS7 de mono (Riñón-SV40 del mono verde africano transformado) que expresan IGF-1R de mono en su superficie celular. Más exactamente, para la selección por citometría de flujo, 10^5 células (MCF7 o COS7) se sembraron en placa en cada pocillo de una placa

de 96 pocillos en PBS que contiene BSA del 1% y azida de sodio del 0.01% (amortiguador de FACS) a 4°C. Después de una centrifugación de 2 minutos a 2000 rpm, el amortiguador se eliminó y los sobrenadantes del hibridoma que deben analizarse se agregaron. Después de 20 minutos de la incubación a 4°C, las células se lavaron dos veces y anticuerpo de antirratón de cabra Alexa 488 conjugado 1/500° diluido en el amortiguador FACS (#A11017, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) se agregó e incubó durante 20 minutos a 4°C. Después de un lavado final con amortiguador de FACS, las células se analizaron por FACS (Facscalibur, Becton Dickinson) después de la adición del yoduro del propidio a cada tubo a una concentración final de 40 µg/ml. Los pocillos que contienen células solas y células incubadas con anticuerpo conjugado Alexa 488 secundario se incluyeron como controles negativos. Los controles del isotipo se usaron en cada experimento (Sigma, ref M90351MG). Por lo menos 5000 células se evaluaron para calcular el valor medio de la intensidad de la fluorescencia (MFI).

Además, un ensayo de la internalización se llevó a cabo para seleccionar únicamente anticuerpos internalizantes. Para este ensayo, la línea de célula tumoral MCF7 se cultivó en 1640 RMPI sin el rojo fenol con L-glutamina del 1% y el 10% de FACS durante 3 días antes del experimento. Las células se separaron luego utilizando tripsina y 100 µl de una suspensión celular a 4.10^5 células/ml se siembran en placa en placas de 96 multipocillos en RPMI1640 sin el fenol rojo con L-glutamina del 1% y FBS del 5%. Después de una centrifugación de 2 minutos a 2000 rpm, las células se suspendieron de nuevo en 50 µl de sobrenadante del hibridoma o soluciones de anticuerpo de control (controles de isotipo y positivo a 1µg/ml). Después de un período de incubación de 20 minutos a 4°C, las células se centrifugaron 2 minutos a 2000 rpm y se suspendieron de nuevo en medio de cultivo completo frío (4°C) o calor (37°C). Las células se incubaron luego durante 2 horas a 37°C o a 4°C. Luego las células se lavaron tres veces con amortiguador de FACS. El anticuerpo de IgG de cabra antirratón Alexa 488-marcado se incubó durante 20 minutos y las células se lavaron tres veces antes del análisis de FACS en la población celular negativa de yoduro del propidio.

Siguiendo al análisis FACS, dos parámetros se determinaron: (i) la diferencia de la señal fluorescente detectada en la superficie de células incubadas a 4°C con las obtenidas con las células incubadas a 37°C con un sobrenadante del hibridoma y (ii) el porcentaje de IGF-1R restante en la superficie celular.

El porcentaje de hIGF-1R restante se calcula así:

$$\% \text{ IGF-1R restante} = (MFI_{Ab\ 37°C}/MFI_{Ab\ 4°C}) \times 100$$

Además, se realizaron tres ELISA (antes o después de clonarse) para estudiar la unión de anticuerpos en las proteínas de humano recombinante (hIGF-1R) y murino (mIGF-1R), y en la proteína de receptor de insulina humano recombinante (hIR). Los hibridomas que secretan anticuerpo muestran unión en rh- y/o rm-IGF-1R y no unión en rhIR se mantuvieron. Brevemente, las placas de ELISA de 96 pocillos (Costar 3690, Corning, NY, USA) se recubrieron con 100 µl/pocillo de cualquiera la proteína rhIGF-1R (R&D Systems, cat N ° 391-GR) a 0.6 µg/ml o proteína rmIGF-1R (R&D Systems, cat N°6630-GR/Fc) a 1 µg/ml o proteína rhIR (R&D Systems, cat N°1544-IR/CF) a 1 µg/ml en PBS durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon luego con PBS que contiene gelatina del 0.5% (#22151, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania) durante 2 h a 37°C. Una vez el amortiguador de saturación es desechado por placas de sacudida, 100 µl de cada dilución del sobrenadante se agregaron a los pocillos (sobrenadante del hibridoma no diluido o diluciones en serie de sobrenadante) e incubaron durante 1 h a 37°C. Después de tres lavados, 100 µl de Ig de cabra antirratón policlonal conjugada por peroxidasa de rábano (#115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., Wesr Grove, PA, USA) se añadierond a una dilución de 1/5000 en PBS que contiene gelatina al 0.1% y Tween 20 al 0.05% (w:w) durante 1 h a 37°C. Luego, las placas de ELISA se lavaron 3 períodos de tiempo y el sustrato de TMB (#UP664782, Uptima, Interchim, Francia) se agrega. Después de un período de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, la reacción es detenida utilizando ácido sulfúrico de 1 m y la densidad óptica a 450 nm se cuantifica.

El hibridoma que secreta el anticuerpo de interés se expandió y se clonó por la dilución límite. Una vez isotipado, un clon de cada código se expandió y congeló. Cada anticuerpo de interés se produjo en sistemas de producción *in vitro* denominados CellLine (Integra Biosciences) para una caracterización adicional.

Unos ensayos adicionales para enviar la especificidad de unión mediante análisis FACS se llevaron a cabo en células IM9 (IR de humano que expresa linfoblastos B) así como en células transfectadas hIGF-1R frente a células no transfectadas.

Todos los datos correspondientes a los anticuerpos seleccionados se resumen en la tabla 8. Es interesante notar que entre los anticuerpos seleccionados i) sobre las bases de su selectividad para hIGF-1R *vs* hIR e ii) en su capacidad de inducir la internalización de IGF-1R, unos son capaces de reconocer su objetivo tanto en ELISA como en configuración de FACS mientras otros eran buenos agentes aglutinantes cuando se estudian por citometría y muy deficientes agentes aglutinantes cuando se evalúan por ELISA. Los m280F2, m212A11, m213B10, m214F8 y m219D6 pertenecen a este último grupo que no reconoció bien la proteína recubierta.

Tabla 8

	nombre de hibridoma	ELISA (SNT a 5 µg/ml) D.O 450 nm			Ensayo de Internalización (Ab a 5 µg/ml)				FACS (Ab a 5 µg/ml)			
					MFI				MFI			
		rh IGF-1R	rm IGF-1R	rh Insulina R	4°C	37°C	% rh IGF1R restante	Δ (MFI 4°C - MFI 37°C)	IM9 (h IR$^+$)	Cos-7 (IGF1R+ de mono)	Tf hIGF1R+	células no Tf(h IGF1R$^-$)
1	101H8	1.552	0.115	0.125	373	128	34	246	9	145	1902	10
2	102H8	1.988	0.136	0.130	360	140	39	220	10	136	2026	10
3	105G2	2.409	0.166	0.205	301	114	38	187	9	114	1673	11
4	110G9	1.989	0.133	0.153	396	126	32	270	10	146	2208	7
5	201F1	1.756	0.165	0.156	357	81	23	276	8	119	1987	15
6	208F2	0.163	0.099	0.140	355	94	27	261	4	106	2197	22
7	212A11	0.232	0.102	0.141	390	106	27	284	7	125	2187	23
8	213B10	0.399	0.127	0.110	386	115	30	271	7	122	2055	23
9	214F8	0.349	0.102	0.115	386	111	29	275	7	132	2137	20
10	219D6	0.329	0.112	0.106	349	106	30	243	7	114	2110	21
11	410G4	2.937	0.135	0.095	619	229	37	390	11	158	2260	34
12	414E1	3.009	0.099	0.093	729	188	26	540	13	204	2740	36
13	415A8	3.044	0.107	0.089	727	174	24	553	12	188	2960	32
14	433H9	3.104	0.154	0.131	617	153	25	464	13	206	2590	24
15	832E5	1.854	0.107	0.048	134	82	61	52	5	24*	nd	nd
15	mIgG1	0.093	0.116	0.127	9	8	94	1	5	14	24	22
* FACS llevado a cabo utilizando anticuerpo purificado												

Ejemplo 2: Caracterización de agrupación de epítopo de anticuerpos anti-IGF-1R por experimentos de mapeo utilizando la tecnología a base de SPR de Biacore

A fin de estudiar la diversidad de respuesta contra IGF-1R, los anticuerpos seleccionados se han mapeado por Biacore y se ha realizado un agrupamiento de estos anticuerpos según las propiedades de competición.

Brevemente, los experimentos de mapeo del epítopo se ejecutaron en un dispositivo Biacore X utilizando un circuito integrado del sensor CM5 activado por un anticuerpo anti-Tag His (número de catálogo de Healthcare GE de kit de captura His 28-9950-56). Más de 11000 RU de anticuerpos químicamente se injertan en la matriz de carboximetildextrano utilizando la química del kit de la amina. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C con velocidad de flujo de 1 µl/min utilizando el amortiguador de HBS-EP (GE Healthcare) como tanto la ejecución y el amortiguador de dilución de la muestra.

El experimento de mapeo del epítopo siguió el mismo esquema:

1- Una solución de una versión soluble de heterotetrámero hIGF-1R (2α cadenas y los dominios extracelulares de las 2β cadenas expresadas con un c-terminal 10 adicional 10-His tag (R&D Systems número del catálogo 305-GR)) se inyecta a la concentración de 5 µg/ml en ambas celdas de flujo durante 1 minuto.

2- Una solución de un anticuerpo anti-hIGF-1R (clásicamente 50 µg/ml) que debe analizarse se inyecta luego únicamente en la celda de flujo 1 durante entre 60 a 90 s a fin de alcanzar (o por lo menos próxima a) una saturación de los sitios de unión hIGF-1R.

3- Una solución de un segundo anticuerpo, usado como un competidor potencial, se inyecta en las mismas condiciones en ambas celdas de flujo o únicamente en la segunda celda de flujo

4- Evenvualmente, una solución de un tercer anticuerpo puede inyectarse en las mismas condiciones en ambas celdas de flujo.

5- La superficie se regenera luego con una inyección de glicina de 10 mm, amortiguador de pH de HCl 1.5 durante 30 s.

Esta clase del experimento muestra claramente si dos anticuerpos pueden unirse simultáneamente en la misma molécula de hIGF-1R demostrando que las regiones de unión (epítopos) de cada anticuerpo son bastante distantes para permiten esto. En contraposición, si la unión de un anticuerpo a hIGF-1R evita la unión de un segundo anticuerpo sugiere que el mismo epítopo era reconocido por ambos anticuerpos. Finalmente, en caso de competencia parcial, puede sospecharse una superposición de los epítopos reconocidos por los dos anticuerpos analizados. Los grupos de la región del epítopo son así definidos. La complejidad del resultado generalmente

aumenta con el tamaño del panel de anticuerpos usados en el experimento.

La figura 1 describe un ejemplo de un ciclo común de un experimento de mapeo del epítopo utilizando un dispositivo X Biacore a base de SPR. Los sensogramas muestran la respuesta (RU) como la función al período de tiempo (segundos) de las celdas de flujo 1 (diamantes negros) y 2 (diamantes blancos). En la fase 1, una solución del antígeno: hIGF-1R recombinante soluble con dos 10-His Tag c-teminales se inyecta en ambas celdas de flujo de CM5 sensorchip con anticuerpo del ratón anti-His Tag enlazado químicamente a la matriz de carboximetildextrano a la concentración de 5µg/ml a velocidad de flujo de 10 µl/min.

En la fase 2, una solución de un primer anticuerpo que debe analizarse (219D6) a la concentración de 50 µg/ml se inyecta en la celda de flujo 1. Luego en la fase 3, una solución de un segundo anticuerpo (101H8) a la concentración de 50 µg/ml se inyecta en la celda de flujo 2, seguido en la fase 4, por la inyección de una solución de un tercer anticuerpo (201F1) a la concentración de 50 µg/ml en ambas celdas de flujo. La respuesta de esta inyección claramente muestra que la unión de 201F1 en el IGF-1R se evita por 101H8, pero no por 219D6. Los anticuerpos 201F1 y 219D6 claramente pertenecen a diferentes grupos del epítopo. La agrupación que resulta al análisis completo de los 15 candidatos seleccionados se describe en la figura 2 y demostró que la inmunización de ratones con hIGF-1R aumenta una serie de anticuerpos que muestran una diversidad adecuada. En efecto, 5 diferentes grupos de Mabs que reconocen diferentes epítopos se generaron.

Ejemplo 3: unión de anticuerpo a IGF-1R de origen natural de humano mediante análisis FACS

Las propiedades de unión de una serie de anticuerpos anti-IGF-1R fueron evaluadas mediante análisis FACS en la línea celular del adenocarcinoma de mama MCF-7 de humano (ATCC#HTB-22) utilizando concentraciones del anticuerpo crecientes. Con ese objetivo, células ($1x10^6$ células/ml) se incubaron con anticuerpos anti-IGF-1R durante 20 minutos a 4°C en el amortiguador de FACS (PBS, BSA del 0.1%, NaN_3 del 0.01%). Se lavaron luego 3 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado conectado con Alexa 488 durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad antes de lavarse 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-IGF-1R inmediatamente se llevó a cabo en células viables que se identificaron al usar el yoduro del propidio (que tiñe células muertas). El máximo de la intensidad de la señal obtenida con cada anticuerpo se diseñó como B_{max} y se expresó para en la media de la intensidad de la fluorescencia (MFI). La EC_{50} de unión expresada en la molaridad (M) se calculó al usar un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0).

La curva de la titulación de cada Ab quimérico o murino demostró que todos los anticuerpos generados presentan capacidad de reconocer la forma de IGF-1R de origen natural con un perfil de saturación típico (figura 3A). A fin de clasificar anticuerpos y comparar las propiedades de unión tanto del Abs quimérico como murino, la unión $_{EC50}$ de cada compuesto se determinó mediante la utilización un análisis de la regresión no lineal. La comparación de la EC_{50} de cada Ab murino con su forma quimérica correspondiente mostró que 2 formas mostraron las mismas propiedades de unión que demuestran que dimerización de Ab no afectó el reconocimiento de IGF-1R (Figura 3B). La EC_{50} estaba comprendida entre $1.2x10^{-8}$ y $4.4x10^{-10}$. Los anticuerpos que pertenecen al Grupo 2 y c102H8 que pertenece al grupo 3a mostraron la mejor EC_{50}. En cuanto al análisis de Bmax (Figura 3C), tres Abs (414E1 (G3b), 105G2 (G4) y 832E5 (G5) presentaron B_{max} inferior comparado con el otro. EC_{50} y los valores de B_{max} se resumieron en la tabla 9.

Tabla 9

Grupo	Ac	B_{max}	EC_{50}(M)
G1	c101H8	905	2.8E-09
G3a	c102H8	951	8.5E-10
G4	c105G2	805	4.9E-09
G3a	c110G9	992	1.4E-09
G1	c201F1	936	1.5E-08
G2	c208F2	981	6.7E-10
G2	c212A11	991	6.7E-10
G2	c214F8	1069	5.0E-10
G2	c219D6	993	4.7E-10
G2	c213B10	1103	4.4E-10
G3b	c410G4	1020	2.6E-09
G3b	c414E1	795	6.0E-09
G3a	c415A8	1142	1.6E-09
G3b	c433H9	1032	1.7E-09
G5	c832E5	691	1.2E-08

Ejemplo 4: confirmación de la especificidad del anticuerpo utilizando células transfectadas IGF-1R o IR o células IM9 que naturalmente expresan niveles significativos de IR

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos generados para hIGF-1R frente a hIR, los transfectantes estables que expresan hIGF-1R o hIR fueron evaluados mediante análisis FACS. Brevemente, las concentraciones crecientes de mAbs quiméricos se incubaron con células durante 20 minutos a 4°C en el amortiguador de FACS (PBS, 0.1%BSA, NaN_3 del 0.01%). Las células se lavaron luego 3 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado con Alexa 488 antes de incubarse durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad y luego se lavaron 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-IGF-1R inmediatamente se llevó a cabo en células viables que se identificaron usando el yoduro del propidio (que tiñe células muertas). La unión EC_{50} que se expresa en la molaridad (M) se calculó usando un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0).

Las curvas de la titulación obtenidas en la línea celular transfectada de hIGF-1R (figura 4A) *frente a* las células no transfectadas (figura 4B) confirmaron la especificidad de unión de Abs quimérico para IGF-1R de humano. Los valores de EC_{50} y B_{max} se resumieron en la tabla 10. En este ensayo los anticuerpos de los grupos G2 y G3a mostraron mejor EC_{50}.

Tabla 10

Grupo	Ac	B_{max}	EC_{50} (M)
G1	c101H8	2107	1.2E-09
G1	c201F1	2500	1.1E-08
G2	c208F2	2008	3.2E-10
G2	c212A11	2513	4.4E-10
G2	c214F8	2094	2.7E-10
G2	c219D6	2521	5.5E-10
G2	c213B10	2029	3.3E-10
G3a	c102H8	2594	5.4E-10
G3a	c110G9	2189	5.2E-10
G3a	c415A8	2728	7.0E-10
G3b	c410G4	1667	7.1E-10
G3b	c414E1	2265	1.9E-09
G3b	c433H9	2165	6.5E-10
G4	c105G2	2396	1.7E-09
G5	c832E5	1998	7.3E-09

A fin de verificar la ausencia de unión tanto de anticuerpos quiméricos como murinos en hIR, una línea celular estable que expresa IR de humano se usó. El reconocimiento de hIR de superficie celular humana tanto por Ab quimérico como murino se llevó a cabo mediante análisis FACS. Las concentraciones crecientes de mAbs murinos o quiméricos se incubaron en la línea celular transfectada hIR^+ durante 20 minutos a 4°C en amortiguador de FACS (PBS, 0.1% de BSA, NaN_3 del 0.01%). Las células se lavaron luego 3 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado con Alexa 488 antes de incubarse durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad y luego se lavaron 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-IGF-1R inmediatamente se llevó a cabo en células viables que se identificaron usando el yoduro del propidio (que tiñe células muertas). La unión EC_{50} que se expresa en la molaridad (M) se calculó usando un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0). Un anticuerpo anti-IGF-1R específico comercial, clon GR11L y el clon de anticuerpo anti-hIR GRO5 se usaron como controles positivos. El c9G4 se introdujo como un anticuerpo irrelevante (control del isotipo).

El alto nivel de expresión de hIR en la superficie celular de las células transfectadas se confirmó usando el anticuerpo anti-hIR comercial GRO5. Incluso usando elevadas concentraciones de Abs anti-HhIGF-1R murino (Figura 5A) o quimérico (Figura 5B), no se observa unión sobre la superficie celular de las células transfectadas hIR^+. Estos resultados demostraron que ni Abs anti-hIGF-1R murinos ni quiméricos reconocieron hIR.

Esta especificidad del reconocimiento de hIGF-1R *frente a* IR también se ha demostrado usando células de IM9, una línea celular del B-linfoma que expresan hIR (Figura 6). Para este análisis FACS, el protocolo era igual que el que descrito previamente y los anticuerpos anti-IGF-1R de murino se utilizaron a fin de evitar la reactividad reticulada de Ab anti-humano secundario (las células de IM9 expresan para Ig de humano en su superficie celular). Los resultados presentados en la figura 6 demostraron otra vez que la señal prevista se observó utilizando el anticuerpo GRO5 anti-hIR mientras ninguno del anticuerpo de murino evaluado mostró ninguna señal de unión significativa en esta línea celular.

Ejemplo 5: unión del anticuerpo al IGF-1R natural de mono mediante análisis de Biacore y FACS

Uno del primer requisito previo para estudios de toxicología reguladores es identificar una especie de animal relevante para evaluar el compuesto seleccionado. Como la serie de anticuerpos descritos en la presente memoria no es capaz de reconocer el IGF-1R de murino, la especie más probable para la evaluación toxicológica es el primate no humano (NHP).

A fin de evaluar la unión de anticuerpos anti-IGF-1R en el IGF-1R de mono, la unión tanto de anticuerpos anti-hIGF-1R quiméricos como murinos fue evaluada por los análisis de FACS en la línea celular COS-7 que utiliza concentraciones de anticuerpo crecientes. Las células ($1x10^6$ células/ml) se incubaron con anticuerpos anti-IGF-1R durante 20 minutos a 4°C en el amortiguador de FACS (PBS, 0.1%BSA, NaN_3 del 0.01%). Luego, las células se lavaron 3 veces e incubaron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado con Alexa 488 antes de incubarse durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad y finalmente se lavaron 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-IGF-1R inmediatamente se evaluó en células viables identificadas usando el yoduro del propidio (que tiñe células muertas). La unión EC_{50} que se expresa en la molaridad (M) se calculó usando un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0).

Las curvas de la titulación obtenidas en la línea celular COS-7 de mono mostraron que, excepto para el 832E5 mAb, todos los Abs anti-hIGF-1R reconocieron específicamente el IGF-1R expresado en la superficie de la línea celular del mono (Figura 7A). La determinación de EC_{50} para cada Abs quimérico y murino mostró que las 2 formas se compararon bien en cuanto a sus propiedades de unión en el IGF-1R de mono (Figura 7B). Aquellos resultados mostraron que todo el anti-hIGF-1R generado excepto mAb 832E5 reconoció el IGF-1R de mono.

Una comparación de unión EC_{50} en células COS-7 *con respecto* a células IGF-1R transfectadas se llevó a cabo a fin de verificar la magnitud del reconocimiento del anticuerpo quimérico en el IGF-1R humano *con respecto* mono IGF-1R. Los resultados mostrados en la figura 7B demostraron un reconocimiento similar de IGF-1Rs de humano y mono por todos los anticuerpos excepto el 832E5 mAb.

A fin de confirmar el reconocimiento sobre otro tipo del mono, las células se transfectaron con el *Mono cinomolgo* de forma de IGF-1R para producir IGF-1R ECD de mono soluble y los experimentos de Biacore se llevaron a cabo con uno de los anticuerpos quiméricos (c208F2) a fin de comparar sus propiedades de unión tanto el hIGF-1R o IGF-1R de cinomolgo.

Los experimentos de reconocimiento se ejecutaron en un dispositivo Biacore X100 usando un circuito integrado del sensor CM5 activado por un anticuerpo anti-Tag His (número de catálogo de Healthcare GE kit de captura His 28-9950-56). Más de 11000 RU de anticuerpos químicamente se injertan en la matriz de carboximetildextrano utilizando la química del kit de la amina. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C con velocidad de flujo de 30 µl/min utilizando el amortiguador de HBS-EP (GE Healthcare) como el amortiguador de la dilución de la muestra y ejecución. El esquema cinético de ciclo único se utilizó para los parámetros cinéticos definidos de la unión de la forma quimérica del anticuerpo 208F2 anti-IGF-1R (c208F2) en hIGF-1R comparado con IGF-1R de macaco.

Una solución de una versión recombinante soluble de heterotetrámero IGF-1R compuesto por 2β cadenas y los dominios extracelulares de 2α cadenas expresadas con un 10-His Tag c-terminales, basado en la secuencia del humano (número de catálogo R&D Systems 305-GR-50) o de la del cinomolgo (producido domésticamente) se inyectó 1 minuto en la segunda celda de flujo a una dilución definida para capturar aproximadamente 160 RU del antígeno. La solución de un segundo anticuerpo o se inyecta en las mismas condiciones en ambas celdas de flujo o únicamente en la segunda celda de flujo. Después de la fase de captura, el amortiguador de ejecución se inyectó 5 veces (90 s cada inyección) o un intervalo creciente de 5 concentraciones de c208F2 se inyectaron (90 s cada inyección) en ambas celdas de flujo. Al final de quinta inyección el amortiguador de ejecución se hizo pasar a fin de definir la tasa de la disolución. La superficie se regeneró luego con una inyección de glicina de 10 mM, amortiguador de pH de 1.5 HCl durante 30 s.

La señal computadorizada corresponde a la diferencia entre la respuesta de la celda de flujo 2 (con IGF-1R capturado) y respuesta de la celda de flujo 1 (sin cualquier molécula IGF-1R) (figura 8).

Para cada molécula IGF-1R (humana o cino), la señal debida a las inyecciones del intervalo creciente de concentraciones de c208F2 se corrigió por la sustracción de la señal obtenida con las 5 inyecciones del amortiguador (doble referencia). Los sensogramas resultantes se analizaron usando el software Biaevaluation con un modelo 1:1. Las tasas cinéticas se evalúan indistintamente (2 tasas de cinética de la unión de c208F2 en cada IGF-1R) o comúnmente (las mismas tasas cinéticas de la unión de c208F2 en el IGF-1R de humano o cinomolgo). La calidad del ajuste se evaluó por una proporción Chi2/Rmax inferior a 0.05 RU.

Las tasas cinéticas de la unión (ver la tabla 11) definidas por separado para cada IGF-1R son cercanas y un ajuste de ambos sensogramas con las mismas tasas cinéticas es de la buena calidad. El anticuerpo c208F2 reconoce también IGF-1R de humano y cinomolgo recombinantes con una constante de disociación (KD) sobre 0.2nM. Las afinidades definidas en este estudio corresponden a las afinidades funcionales (o avideces) de los anticuerpos

para un nivel de IGF-1R de humano y cinomolgo capturado de alrededor 160RU.

Tabla 11

IGF1R	kon [1/M.s]	koff [1/s]	Kd [nM]	Chi2/Rmax
humano	1.52E+06	3.40E-04	0.23	0.045
cinomolgo	1.85E+06	3.10E-04	0.17	0.032
Hum. y Cino.	1.52E+06	3.33E-04	0.22	0.039

Ejemplo 6: efecto intrínseco de anticuerpos generados sobre la fosforilación de IGF-1R

Es bien conocido que los anticuerpos podrían inducir un efecto agonístico cuando se unen a los receptores de la tirosina cinasa. Como no nos gustaría seleccionar tales anticuerpos de agonista, la evaluación de fosforilación hIGF-1R se estudió usando los anticuerpos quiméricos.

Con ese objetivo, las células de MCF-7 se incubaron en un medio sin suero durante la noche. Luego, IGF-1 (100nM) o Abs que deben analizarse se agregaron (10 µg/ml) durante 10 minutos a 37°C. El medio se desechó y las células se descartaron en un amortiguador de la lisis (pH 7.5) conteniendo amortiguador 10 mm Tris de HCl (pH 7.5), NaCl del 15% (1M), mezcla detergente del 10% (10 mm Tris-HCl, amortiguador de la lisis de Igepal del 10%) (Sigma Chemical Co.), sodio desoxicolato del 5% (Sigma Chemical Co.), 1 comprimido de TM completo de cóctel del inhibidor de la proteasa (Roche), conjunto del cóctel del inhibidor de la fosfatasa del 1% II (Calbiochem), durante 90 minutos a 4°C. Los productos de la lisis fueron depurados por la centrifugación a 4°C, se calentaron durante 5 minutos a 100°C y mantuvieron a-20°C o directamente cargados en geles del SDS-PAGE del 4-12%. La incubación del anticuerpo primario se llevó a cabo durante 2 hr a temperatura ambiente y luego la incubación con anticuerpos secundarios unidos HRP se llevó a cabo durante 1 hr a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron en TBST antes de la visualización de proteínas con ECL. Las manchas se cuantificaron usando el software Image J. Los valores de la fosfoproteína se normalizaron con GAPDH. La fosforilación de hIGF-1R en respuesta a IGF-1 se consideró como 100% de la estimulación. El efecto de Abs anti-hIGF-1R sobre la fosforilación de hIGF-1R se determinó como el % de fosforilación inducida por IGF-1.

Los resultados descritos en la figura 9 representan la media del % de pIGF-1R en respuesta a los Abs anti-IGF-1R quiméricos de 3 experimentos independientes +/-S.D. en comparación con IGF-1. Como se muestra se detectó una fosforilación no significativa o menor (<20%) de hIGF-1R cuando las células MCF-7 se incubaron con 10µg de Abs anti-IGF-1R.

Ejemplo 7: inhibición de la fosforilación de IGF-1R en respuesta a IGF-1 por anticuerpos anti-hIGF-1R de murino

A fin de caracterizar los anticuerpos seleccionados, su capacidad de inhibir fosforilación inducida por IGF1 se estudió. Con ese objetivo, las células de MCF-7 se incubaron en un medio sin suero durante la noche. Luego, las células se incubaron durante 5 minutos con el Ab anti-hIGF-1R murino antes de la adición de IGF-1 durante 2 minutos a 37°C. El medio se desechó y las células se descartaron en un amortiguador de la lisis (pH 7.5) conteniendo amortiguador 10 mM Tris de HCl (pH 7.5), NaCl del 15% (1M), mezcla detergente del 10% (10 mM Tris-HCl, amortiguador de la lisis de Igepal del 10%) (Sigma Chemical Co.), sodio desoxicolato del 5% (Sigma Chemical Co.) 1 comprimido de TM completo de cóctel del inhibidor de la proteasa (Roche), conjunto del cóctel del inhibidor de la fosfatasa del 1% II (Calbiochem), durante 90 minutos a 4°C. Los productos de la lisis fueron depurados por la centrifugación a 4°C, se calentaron durante 5 minutos a 100°C y mantuvieron a-20°C o directamente se cargaron en geles de SDS-PAGE del 4-12%. La incubación del anticuerpo primario se llevó a cabo durante 2 hr a temperatura ambiente y luego la incubación con anticuerpos secundarios unidos a HRP se llevó a cabo durante 1 hr a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron en TBST antes de la visualización de proteínas con ECL. Las manchas se cuantificaron usando el software Image J. Los valores de la fosfo- proteína se normalizaron con GAPDH. La fosforilación de hIGF-1R en respuesta a IGF-1 se consideró como el 100% de la estimulación. El efecto de Abs anti-hIGF-1R sobre la fosforilación de hIGF-1R se determinó como el % de la fosforilación inducida por IGF-1.

La adición de m105G2, m101H8 o de m9G4, un anticuerpo de murino irrelevante, no inhibió la fosforilación de hIGF-1R en respuesta a IGF-1 (figura 10). La adición de m201F1 disminuyó moderadamente la fosforilación de hIGF-1R en respuesta a IGF-1 (~40% de la disminución). Todos los otros Abs anti-IGF-1R inhibieron fuertemente la fosforilación de hIGF-1R en respuesta a IGF-1 (disminución > 80%). Los mejores inhibidores de la fosforilación inducida por IGF1 de hIGF-1R son Mabs m208F2, m212A11 y m214F8.

Ejemplo 8: estudio de la internalización de IGF-1R después de unir los anticuerpos anti-IGF-1R generados mediante análisis FACS

Las células de MCF-7 se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos quiméricos a 4°C durante 20 minutos. Luego, las células se lavaron e incubaron a 4°C o 37°C durante 4 h. La cantidad del anticuerpo ligado a la superficie celular

se determinó usando un anticuerpo secundario en un citómetro FacsCalibur Flow (Becton Dickinson). La ΔMFI definida como la diferencia entre MFI cuantificada a 4°C y MFI cuantificada a 37°C después de un período de incubación de 4 horas correspondió a la cantidad de Ab interiorizado. La ΔMFI se presenta en figuras 11A y 11B y la tabla 12. El porcentaje de la internalización a 10 µg/ml de Ab se calculó como sigue 100* (MFI a 4°C-MFI a 37°C)/MFI a 4°C y se presenta en la tabla 11. El máximo de ΔMFI calculada para cada anticuerpo quimérico (figuras 11A y 11B) no mostró ninguna correlación entre el grupo y el máximo de internalización.

Tabla 12

Grupo	Abs	% de internalización	ΔMFI	EC_{50}
G1	c101H8	75	254	4.2E-09
G1	c201F1	75	222	8.4E-08
G2	c208F2	83	288	1.8E-10
G2	c212A11	80	322	2.7E-10
G2	c214F8	87	403	2.2E-10
G2	c219D6	80	353	4.4E-10
G2	c213B10	85	369	2.3E-10
G3a	c102H8	71	262	7.9E-10
G3a	c110G9	79	309	1.2E-09
G3a	c415A8	78	327	1.2E-09
G3b	c410G4	82	321	3.7E-09
G3b	c414E1	68	229	3.1E-09
G3b	c433H9	79	323	1.1E-09
G4	c105G2	81	260	7.2E-09
G5	c832E5	40	92	2.0E-08

A fin de Determinar si los anticuerpos que también reconocieron el IGF-1R de mono eran capaces de interiorizar este receptor, el mismo experimento de la internalización se llevó a cabo. Los resultados resumidos en la tabla 13 demostraron que todos los anticuerpos analizados eran capaces de regular la internalización de IGF-1R de mono.

Tabla 13

		Abs de murino		Abs quiméricos	
Grupo	Abs	ΔMFI	% de internalización	ΔMFI	% de internalización
G1	101H8	73	73	85	73
G1	201F1	66	65	76	60
G2	208F2	53	74	52	67
G2	212A11	83	73	98	75
G2	214F8	76	71	98	72
G2	219D6	80	71	102	74
G2	213B10	84	74	101	73
G3a	102H8	60	55	74	54
G3a	110G9	69	59	93	61
G3a	415A8	89	65	121	68
G3b	410G4	51	49	87	58
G3b	414E1	93	67	59	54
G3b	433H9	80	61	98	63
G4	105G2	68	67	94	72

La cinética de la disminución del anticuerpo ligada a la superficie celular se evaluó adicionalmente. Con ese objetivo, las células de MCF-7 se sembraron en placas de 96 pocillos e incubaron con 10 µg/ml del murino durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron luego para eliminar el anticuerpo no unido y en medios a 37°C durante 10, 20, 30, 60 o 120 minutos. En cada punto temporal, las células se centrifugaron y a continuación se marcaron en superficie en hielo con IgG-Alexa488 antirratón secundario para determinar la cantidad de anticuerpo que permanece en la superficie celular. La intensidad de la fluorescencia para cada Ab murino y para cada punto temporal fue normalizada por la señal a 4°C (% de IGF-1R restante) y ajustada a una extinción exponencial para determinar la vida media (t1/2). La t1/2 se consideró como el tiempo necesario para obtener una disminución del 50% de la señal cuantificada a 4°C. Como se muestra en figuras 12A y 12B, el nivel de superficie de todos los Abs murinos decayó rápidamente durante los 30 primeros minutos y la disminución era prácticamente máxima después de 60 minutos de la incubación (figura 12A). La vida media calculada estaba comprendida entre 10 y 18 minutos en cuanto al Ab murino (figura 12B). No existía correlación entre la extinción de la superficie del anticuerpo y el grupo de Abs.

A fin de validar que la disminución de la señal de la superficie celular era debida a la internalización de Ab y no debido a la liberación del receptor, las células se incubaron con Abs murinos durante 0, 30 y 60 minutos à 37°C

(figura 13). Las células se fijaron luego y permeabilizaron o no a fin de determinar el anticuerpo unido a la superficie celular (sin permeabilización) y la señal del anticuerpo total correspondiente a Ab internalizado – ligado a superficie celular (con permeabilización). La cantidad de Ab interiorizado (citoplásmico) se determinó como sigue: MFI después de permeabilización - MFI sin permeabilización. Este experimento mostró que la disminución de Ab ligado a la superficie celular era debida a un aumento de Abs citoplásmicos que demuestra que Abs se interiorizaron (figura 13). Además, la degradación de Abs comenzó después 1h de la incubación como indica la disminución de la señal después de la permeabilización (total).

Ejemplo 9: estudio de internalización de IGF-1R después de la unión de los anticuerpos anti-IGF-1R generados mediante análisis confocales

Para confirmar adicionalmente la internalización de anticuerpos, la microscopía confocal se llevó a cabo para evaluar la distribución subcelular de anticuerpos siguiendo al tránsito celular. Las células se incubaron con Abs anti-hIGF-1R 37°C, fijados y permeabilizados. Por lo tanto, las células se tiñeron usando un anticuerpo secundario Alexa-488 y con anticuerpo de conejo anti-lLamp-1 que se reveló usando un Alexa 555 IgG anticonejo secundario. Antes de la incubación a 37°C, el Ab 208F2 murino se localizó en la membrana de células MCF-7 (figura 14A) y ninguna colocalización con el marcador del lisosoma, lamp-1 se observó usando la colocalización el programa highliter del software ImageJ. El anticuerpo ligado a la superficie celular disminuyó notablemente después de 15 minutos de la incubación. Concomitantemente a la disminución del anticuerpo ligado a la superficie celular, el anticuerpo intracelular se detectó en las vesículas. La colocalización rara con lamp-1 podría observarse. Después de 30 minutos de la incubación, el anticuerpo ligado a la superficie celular apenas se detectó. Sin embargo, la colocalización de Ab en el lisosoma aumentó. Después de 1h de la incubación, la tinción de Ab intracelular disminuyó así como la cantidad de colocalización con lamp-1. Esta cinética del anticuerpo ligado a la superficie celular y su acumulación intracelular correlaciona con la cinética de la medida de extinción de la superficie del anticuerpo por FACS. Además, como se ha descrito con estudios de FACS, la degradación de Abs murinos comenzó después 1h de la incubación por la microscopía confocal.

La internalización de todos los otros anticuerpos anti-hIGF-1R murinos y su colocalización con lamp-1 también era evaluada (figura 14B).

Ejemplo 10: inhibición de degradación de Abs usando inhibidor del lisosoma, Bafilomicina A1

A fin de confirmar que los anticuerpos alcanzaron el lisosoma cuando se degradan, las células se sometieron a tratamiento o no con bafilomicina A1, un potente inhibidor de las funciones del lisosoma. Las células se incubaron luego con 10 µg/ml de Ab para ser analizadas a 4°C, se lavaron e incubaron durante 2 h a 37°C. El Ab interiorizado se detectó después de la permeabilización celular usando un Ab Alexa-IgG secundario 488 antirratón. La adición de bafilomicina A1 evitó la degradación de Ab intracelular (figura 15) indicando que los Abs se interiorizaron eficazmente y se degradaron en lisosomas.

Ejemplo 11: efecto del pH sobre la unión de anticuerpo-IGF-1R y correlación con potencia de la citotoxicidad.

Como los anticuerpos se seleccionaron sobre las bases de su potencial internalizante y mostraron anteriormente colocalizar con endosomas tempranos antes de ingresar en el compartimento lisosómico, un enfoque interesante consistió en seleccionar anticuerpos para los cuales la estabilidad de la unión de Ab-hIGF-1R se moduló en cuanto al ambiente del pH y preferentemente anticuerpos que se disociaron preferentemente de IGF-1R cuando el ambiente del pH devino ácido. En efecto, la diferencia primaria entre endosomas tempranos y lisosomas es su pH luminal: en el compartimento del endosoma el pH es aproximadamente 6 mientras que en el compartimento lisosómico el pH es de aproximadamente 4.5.

Es bien conocido que una vez interiorizado después de la unión al ligando (IGF1), el hIGF-1R regresa nuevamente a la superficie celular a través de una vía de reciclaje.

Sin limitarse a una teoría, una hipótesis descrita en la presente memoria es que los anticuerpos más propensos a liberarse de su objetivo temprano en pH ácido favorecerán probablemente el reciclaje objetivo a la membrana y por consiguiente podrían considerarse como mejores candidatos para enfoques de inmunoconjugado. A fin de investigar si algunos de nuestros anticuerpos muestran tal propiedad y correlacionar esta propiedad con la actividad citotóxica, la unión de Mabs anti-hIGF-1R murinos en la línea celular MCF-7 se llevó a cabo en amortiguadores a diferente pH. La concentración creciente de mAbs murinos se incubó en la línea celular MCF-7 durante 20 minutos a 4°C en diferente pH comprendido entre 5 y 8. Las células se lavaron luego 3 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado con Alexa 488 en el amortiguador de FACS. Las células se incubaron durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad y luego se lavaron 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-hIGF-1R inmediatamente se llevó a cabo en células viables que se identificaron usando el yoduro del propidio que tiñó células muertas. La unión EC_{50} que se expresa en la molaridad (M) se calculó usando un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0).

La EC_{50} del anti-hIGF-1R que pertenece al grupo del conglomerado del epítopo 3B no fue considerablemente afectado por el pH (figura 16). La capacidad de unión de Abs anti-hIGF-1R que pertenecen al grupo del conglomerado del epítopo 3a a menudo se potenciaba en pH ácido. Al contrario, la capacidad de unión de Abs anti-hIGF-1R que pertenecen a los grupos del conglomerado del epítopo 1, 2 y 4 se disminuyó en pH ácido.

En el objetivo de determinar si el pH ácido tiene un impacto positivo en la citotoxicidad inducida por un inmunoconjugado, se utilizó el ensayo de humano de Fab-ZAP comercialmente disponible (ATS BIO). Brevemente, las células de MCF7 se sembraron a 2000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y mantuvieron durante la noche para adherirse. El día después, las células se trataron con 0.45 µg/mL de la Fab-ZAP y concentraciones crecientes de Abs anti-IGF-1R quiméricos. El anticuerpo monoclonal de c9G4 que no se une a la superficie celular se usó como un control negativo. Durante el día 6, la viabilidad celular se cuantificó usando el ensayo de viabilidad de la célula de CellTiter Glo Luminesence de Promega (Madison, Wi). Como se muestra en la figura 17A, los Abs anti-IGF-1R de los grupos 4 y 5 no indujeron ninguna citotoxicidad en MCF-7, mientras que una citotoxicidad moderada (grupos 1, 3a y 3b) a elevada citotoxicidad (grupo 2) se cuantificó con los otros grupos. En la figura 17B, la determinación de IC_{50} confirmó que el grupo 2 presenta la potencia citotóxica más elevada que sugiere que estos anticuerpos serán los más adecuados para un ADC (conjugado anticuerpo-fármaco) o un enfoque de ATC.

Los resultados resumidos en la figura 17 mostraron que de entre 15 mabs quiméricos evaluados el mejor efecto citotóxico se alcanzó con c208F2, c219D5, c212A11, c213B10 y c214F8 que todos los que pertenecen al grupo 2. Sin embargo otros anticuerpos del grupo 1 y 4 que también muestran una sensibilidad frente al pH ácido para la unión de IGF-1R, no se agruparon como los mejores candidatos para la citotoxicidad sugiriendo que esta propiedad podría requerirse, pero no suficiente para explicar las propiedades particulares de anticuerpos del grupo 2. A fin de entender mejor que las características particulares de este conjunto de estudios de correlaciones de anticuerpos se llevaron a cabo en cuanto a los datos disponibles para todos los anticuerpos generados. Los resultados de este análisis sugirieron que tanto la inhibición de fosforilación como disminuir la capacidad de unirse a hIGF-1R en un ambiente de pH ácido se requieren para obtener la mejor actividad citotóxica (figura 18). En efecto 101H8 (G1), 201F1 (G1) y 105G2 (G4) cuya unión disminuyó en el ambiente del pH ácido, pero que era inhibidores de la fosforilación pobres, mostraron unas actividades citotóxicas bajas. Por otra parte, 102H8 (G3a), 110G9 (G3a), 415A8 (G3a), 410G4 (G3b), 414E1 (G3b) y 433H9 (G3b) eran potentes inhibidores de la fosforilación inducida por IGF1, pero no sensibles a la variación del pH o cuya unión se potenció en pH ácido, demostraron actividades citotóxicas únicamente moderadas en un ensayo de humano de Fab-ZAP.

La unión de Mabs anti-IGF-1R humanizados en la línea celular MCF-7 se llevó a cabo en amortiguadores a diferente pH. Las concentraciones crecientes de mAbs humanizados se incubaron en la línea celular MCF-7 durante 20 minutos a 4°C en diferente pH que comprende desde 5 a 8. Las células se lavaron a continuación 3 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado con Alexa 488 en el amortiguador de FACS. Las células se incubaron durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad y luego se lavaron 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-IGF-1R inmediatamente se llevó a cabo en células viables que se identificaron usando el yoduro del propidio que tiñó células muertas. La unión EC_{50} expresada en molaridad (M) se calculó usando un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0). Los anticuerpos anti-IGF-1R humanizados mostraron una capacidad de unión inferior en el pH ácido como se ilustra en las figuras 32A y 32B.

Ejemplo 12: Evaluación de formas humanizadas del 208F2 Mab

12.1 Evaluación de la unión y la internalización de la primera forma humanizada hz208F2 VH3/VL3 (a la que se hace referencia asimismo como hz208F2 H026/L024)

La unión de la primera forma humanizada de c208F2 mAb se evaluó en líneas celulares MCF-7, COS-7 y NIH 3T3 IR^+. Las concentraciones crecientes de m208F2, c208F2 o hz208F2 VH3VL3 se agregaron en cada línea celular durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron luego y la unión del mAb analizado se reveló usando el anticuerpo secundario correspondiente. A fin de validar la expresión de IR de humano en la línea celular transfectada, el clon del anticuerpo anti-hIR comercial GRO5 se usó y su perfil de reconocimiento ejemplificado (figura 19D).

La comparación de la forma humanizada con las murina o quimérica en MCF-7 (figura 19A) o COS-7 de mono (figura 19B) las células mostraron perfiles próximos para las 3 formas analizadas. El proceso de humanización no modificó la especificidad de reconocimiento del anticuerpo que es absolutamente comparable a las formas quiméricas y murinas en cuanto a la ausencia de la reactividad reticulada en el receptor de insulina de humano (figura 19C).

La EC_{50} calculada de primera forma humanizada de c208F2 en la línea celular humana MCF-7 y la línea celular del mono COS-7 eran similares a la determinada con la forma quimérica o murina del 208F2.

La capacidad de mAb hz208F2 VH3/VL3 para interiorizarse se evaluó por la citometría de flujo. Las células de MCF-7 se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos a 4°C durante 20 minutos. Luego, las células se lavaron e incubaron a 4°C o 37°C durante 4 h. La cantidad del anticuerpo ligado de la superficie celular se determinó usando un anticuerpo secundario. La ΔMFI definida como la diferencia entre MFI cuantificada a 4°C y MFI cuantificada a 37°C después de un período de incubación de 4 horas correspondió a la cantidad de Ab interiorizado. La ΔMFI se presentó en la tabla 14a.

El porcentaje de la internalización a 10 µg/ml de Ab se calculó como sigue 100* (MFI a 4°C-MFI a 37°C)/MFI a 4°C y se presenta en la tabla 14a. Por lo tanto, hz208F2 VH3/VL3 humanizada tenía unión similar y unas propiedades de internalización como las medidas con los anticuerpos 208F2 murinos y quiméricos correspondientes.

Tabla 14a

	ΔMFI	% de internalización
m208F2	294	88
c208F2	278	82
Hz208F2 VH3/VL3	344	87

12.2 Evaluación de la unión de formas humanizadas hz208F2 subsecuentes

El mAb 208F2 se humanizó y las propiedades de unión de dieciséis variantes humanizadas (incluyendo la primera forma descrita en 12.1) se evaluaron. Las propiedades de unión de las variantes humanizadas fueron evaluadas mediante análisis FACS en la línea celular del adenocarcinoma de mama MCF-7 de humano y la línea celular de mono Cos-7 utilizando concentraciones del anticuerpo crecientes. Con ese objetivo, unas células ($1x10^6$ células/ml) se incubaron con los anticuerpos humanizados anti-IGF-1R durante 20 minutos a 4°C en el amortiguador de FACS (PBS, BSA del 0.1%, NaN3 del 0.01%). Se lavaron luego 3 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado conectado con Alexa 488 durante 20 minutos adicionales a 4°C en la oscuridad antes de lavarse 3 veces en el amortiguador de FACS. La unión de anticuerpos anti-IGF-1R inmediatamente se llevó a cabo en células viables que se identificaron usando el yoduro del propidio (que tiñe células muertas). La EC_{50} de unión que se expresa en la molaridad (M) se calculó usando un análisis de la regresión no lineal (GraphPad Prims 4.0).

La EC_{50} de variantes humanizadas mostró que todas las variantes humanizadas mostraron las propiedades de unión equivalentes tanto en líneas celulares de humano como de mono.

Las EC_{50} de anticuerpos humanizados se resumieron en la tabla 14b.

Tabla 14b

		EC_{50} (M)	
		MCF-7	Cos-7
Variantes humanizadas	hz208F2 H026/L024	7.09E-10	5.1E-10
	hz208F2 H037/L018	4.9E-10	7.4E-10
	hz208F2 H047/L018	7.7E-10	9.2E-10
	hz208F2 H049/L018	4.9E-10	6.9E-10
	hz208F2 H051/L018	5.7E-10	7.2E-10
	hz208F2 H052/L018	8.4E-10	9.9E-10
	hz208F2 H057/L018	5.8E-10	8.3E-10
	hz208F2 H068/L018	1.1E-09	1.2E-09
	hz208F2 H070/L018	4.6E-10	7.3E-10
	hz208F2 H071/L018	5.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H076/L018	6.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H077/L018	7.7E-10	1.1E-09
	hz208F2 H037/L021	4.8E-10	8.2E-10
	hz208F2 H049/L021	6.6E-10	8.5E-10
	hz208F2 H052/L021	5.7E-10	1.2E-09
	hz208F2 H076/L021	5.8E-10	1.1E-09

12.3 Evaluación de la internalización de otra forma humanizada de hz208F2

Las células de MCF-7 se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos humanizados a 4°C durante 20 minutos. Luego, las células se lavaron e incubaron a 4°C o 37°C durante 4 h. La cantidad del anticuerpo ligado de la superficie celular se determinó usando un anticuerpo secundario en el citómetro FacsCalibur Flow (Becton Dickinson). La ΔMFI definida como la diferencia entre MFI cuantificada a 4°C y MFI cuantificada a 37°C después de un período de incubación de 4 horas correspondió a la cantidad de Ab interiorizado. La ΔMFI se presentó en la tabla 14c. El porcentaje de internalización a 10 µg/ml de Ab se calculó como sigue 100* (MFI a 4°C-MFI a 37°C)/MFI a 4°C. El anticuerpo humanizado hz208F2 H077/L018 es capaz de inducir una internalización significativa de IGF-1R.

Tabla 14c

	ΔMFI	% de Internalización
hz208F2 H077/L018	468	88

Ejemplo 13: IGF-1R como una diana para un enfoque de inmunoconjugado.

Los estudios de IHC se configuraron a fin de validar hIGF-1R como una diana para un enfoque del inmunoconjugado. En efecto una diana útil para tal enfoque requiere una sobreexpresión significativa en células tumorales en comparación con células normales. Otra propiedad de una diana adecuada para un enfoque del inmunoconjugado es su prevalencia de la sobreexpresión en un porcentaje significativo de la población del paciente en muchas indicaciones.

A fin de evaluar si hIGF-IR podría considerarse como una diana adecuada para un enfoque del inmunoconjugado, un anticuerpo policlonal comercialmente disponible (AF305-NA de R&D Systems) descrito como específico del dominio extracelular hIGF-1R (EDC) *con respecto* hIR se seleccionó. La primera etapa de nuestro proceso era verificar la especificidad de AF305-NA para hIGF-1R ECD y su ausencia del reconocimiento de hIR. Con ese objetivo, una serie de pruebas de ELISA se llevó a cabo tanto en IGF-1R de humano como en proteínas hIR ECD usando protocolos ya detallados anteriormente.

Los resultados descritos en la figura 20A demostraron que el anticuerpo anti-hIGF-1R policlonal eficazmente reconoció hIGF-1R ECD. El anticuerpo GR11L (Calbiochem) que se usó como un control positivo proporcionó el perfil previsto. Como se describe por el proveedor, la figura 20B mostró que AF305-NA no reconoce el hIR en contraste con Mab anti-hIR GRO5 (Calbiochem) usado como un control positivo en ELISA. Igualmente, una evaluación de unión de AF305-NA policlonal en células transfectadas hIR^+ mediante análisis FACS confirmaron que no reconoce la forma celular de hIR (figura 20D) mientras que el anticuerpo anti-hIR GRO5 (figura 20C) presentó el perfil previsto en las células transfectadas que demuestran que expresan un alto nivel de hIR. Como se espera, GR11L, que reconoce hIGF-1R, y se introduce en el experimento como un control negativo no muestra ninguna señal en las células transfectadas hIR^+ (figura 20C)

Como el anticuerpo AF305-NA se validó completamente para un estudio de distribución hIGF-1R, un protocolo IHC se configuró en el dispositivo de tinción automática de Discovery Ultra Ventana. Brevemente, después de desparafinar, la recuperación del antígeno se llevó a cabo usando CC1 correspondiente al amortiguador de pH8 de EDTA durante 32 minutos a 96°C. El anticuerpo primario (AF305-NA) se incubó durante 1 h a 37°C. Después del lavado, IgG anticabra de HRP-OMap polimérica IgG (Ventana) se incubó durante 16 minutos a 37°C y luego se reveló utilizando cromógeno DAB. Finalmente, los tejidos se contrateñían utilizando hematoxilina. Los portaobjetos se montaron luego en un medio de Eukitt. A fin de validar la tinción de IHC, un panel de tejidos tumorales del xenoinjerto se seleccionó en cuanto a su expresión *in vitro* de hIGF-1R. Como se muestra en la figura 21, la tinción membranosa potente se observa en los 3 tejidos positivos (MCF-7, NCI-H23 y NCI-H82). Ninguna tinción membranosa se observó en el Hs746t seleccionado como un tumor negativo. Para el análisis de tinción, los portaobjetos se exploraron usando una forma de escáner de HT Roche Ventana y se cuantificó la tinción de IGF-1R usando el software Virtuoso (Roche Ventana). Para el análisis tisular se marcan 4 campos de la vista (FOVs) por tumores, cuando es posible, con más de 50 células para aumentar la exactitud estadística del algoritmo. Los tejidos se puntúan +++ (se describe asimismo como 3 +), ++ a +++ (se describe asimismo como 2 + a 3 + o como ++/+++), ++ (se describe asimismo como 2 +), + (se describe asimismo como 1 +) según el algoritmo membranoso HER2. La puntuación se definió siguiendo la norma de prueba CAP/ASCO como (+) para tinción de la membrana débil o incompleta o tinción de membrana débil, completa de menos de 10% de células en la muestra. Una puntuación de (++) descrita como una tinción de membrana completa que es no uniforme o débil, pero con la distribución circunferencial obvia en por lo menos el 10% de células o tinción de membrana completa intensa en 30% o menos de células tumorales. Una puntuación de (+++) corresponde a una tinción de la membrana intensa uniforme de más de 30% de células tumorales invasivas. Cuando los tumores se puntuaron (++) a (+++), traduce la heterogeneidad en el tejido analizado tumoral (-) significa que ninguna expresión de hIGF-1R se detectó y (c) significa que la tinción es exclusivamente citoplásmica. La tinción citoplásmica se caracteriza por la ausencia de la tinción membranosa que elaboran células aisladas.

Un estudio extendido se llevó a cabo a continuación en tejidos normales y tumorales usando el protocolo anterior (figuras 22 A y B).

Para estos estudios, TMA normal y tumoral de humano de Superbiochips se utilizaron para llevar a cabo unos estudios de la prevalencia y distribución. Dos diferentes controles se introdujeron en cada ciclo del dispositivo de tinción automática. Un control consistió en las secciones de la placenta conocidas por ser un control positivo para su expresión de IGF-1R y provisto de los tejidos TMA normales. Una segunda serie de controles consistió en 3 portaobjetos de tejidos del xenoinjerto tumorales que presentan la puntuación 2 + o 3 + (MCF-7 y NCI-H23, NCI-H82 respectivamente). Este último control se agrega en cada orden de serie de tinción para calibrar la expresión.

Como se esperaba, la placenta y el tejido del xenoinjerto eran, positivos para hIGF-1R. Una tinción membranosa potente se observó en estos 4 controles. En el primer panel de tejidos normales de humano (figura 22A), la leve detección membranosa de IGF-1R que nunca excedió 1 + se observó en la extensión gástrica (esófago, intestino delgado, colon y recto). Para todos los otros tejidos analizados, ninguna expresión membranosa de IGF-1R se observó. En el segundo panel de tejidos de humano normales (figura 22B), la leve detección membranosa de IGF-

1R que nunca excede 1+ se observó en estructuras renales. La tinción membranosa potente (++) se observó en el epitelio de la próstata y en el urotelio. Excepto para estos ambos tejidos, ninguna tinción membranosa potente se observó. Este patrón de la expresión fuertemente sugirió que hIGF-1R podría ser una diana adecuada para enfoques de ATC o ADC.

A fin de determinar las indicaciones potenciales para un inmunoconjugado que se dirige a IGF-1R, unas muestras tumorales de pulmón, mama, cabeza y cuello, vejiga y renales del paciente se analizaron para su expresión de IGF-1R utilizando el protocolo descrito anteriormente.

Entre las 69 muestras pulmonares estudiadas, 67 casos eran interpretables. La expresión de IGF-1R se cuantificó como se describe anteriormente. Como se muestra en la figura 23, la expresión membranosa potente se detecta en muchos carcinomas en comparación con tejidos contiguos normales que son negativos de acuerdo con lo descrito anteriormente en tejidos normales. Todos los casos analizados se resumen en la tabla 15. El 55% de ++ o +++ casos se observa incluyendo todos los subtipos del cáncer de pulmón. Los carcinomas de pulmón de célula escamosa eran los tumores hIGF-1R que más se expresan con 70% ++, ++/+++, o +++ casos y 43% que mantiene únicamente +++ y ++/+++ tumores. Estos resultados están de acuerdo con los datos publicados que describieron polisomías elevadas frecuentes o amplificaciones hIGF-1R en pacientes de carcinoma de pulmón de célula escamosa.

Tabla 15

	EXPRESIÓN DE IGF-1R	**TEJIDO NORMAL**
Adenocarcinoma pulmonar, bien diferenciado 18/30 T2bN2M0 IIIA 103 6	(-)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, bien diferenciado 0/15 T2aN0M0 IB 104 6	(-)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, bien diferenciado 0/39 T2aN0M0 IB 108 6	(+)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, bien diferenciado 22/22 T3N2M0 IIIA 157 6	(-)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, moderadamente diferenciado 0/6 T2aN0M0 IB 156 6	(+)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, moderadamente diferenciado 0/30 T2aN0M0 IB 102 6	(+)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, moderadamente diferenciado 0/12 T2aN0M0 IB 158 6	(+)	(-)
Adenocarcinoma pulmonar, moderadamente diferenciado 2/15 T3N2M0 IIIA 159 6	(-)	(-)
	EXPRESIÓN DE IGF-1R	**TEJIDO NORMAL**
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 5/43 T2aN1M0 IIA 101 6	(+) to (++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 0/15 T2aN0M0 IB 109 6	(+) to (++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 2/20 T3N2M0 IIIA 113 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 4/61 T2aN1M0 IIA 115 6	(++) to (+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 0/17 T2aN0M0 IB 120 6	(++) to (+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 1/46 T2bN1M0 IIB 121 6	(++) to (+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 1/43 T2aN1M0 IIA 123 6	(++) to (+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 8/28 T2aN2M0 IIIA 136 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 0/17 T2aN0M0 IB 137 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 0/19 T2aN0M0 IB 139 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 4/32 T2aN2M0 IIIA 144 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 0/24 T2bN0M0 IIA 148 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, bien diferenciado 5/40 T2bN1M0 IIB 150 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/20 T2aN0M0 IB 155 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 1/15 T2bN1M0 IIB 105 6	(+)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/8 T2aN0M0 IB 106 6	(+) to (++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/16 T3N0M0 IIB 110 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/16 T2aN0M0 IB 118 6	(-)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/34 T2bN0M0 IIA 119 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 5/18 T2aN2M0 IIIA 126 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 1/25 T2aN1M0 IIA 129 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/22 T2bN0M0 IIA 130 6	(++) to (+++)	(-)

	EXPRESIÓN DE IGF-1R	TEJIDO NORMAL
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 3/21 T2aN1M0 IIA 131 6	(-)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 2/18 T1bN1M0 IIA 134 6	(+) to (++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 1/33 T2aN1M0 IIA 138 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 1/25 T2aN1M0 IIA 145 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/21 T2aN0M0 IB 146 6	(++) to (+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, moderadamente diferenciado 0/28 T3N0M0 IIB 151 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/50 T4N0M0 IIIA 132 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 1/3 T2aN2M0 IIIA 135 6	(-)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/22 T3N0M0 IIB 140 6	(+) to (++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/22 T2aN0M0 IB 141 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/18 T2bN0M0 IIA 128 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/11 T2aN0M0 IB 147 6	(+) to (++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/12 T2aN0M0 IB 152 6	(++)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, poco diferenciado 0/14 T3N0M0 IIB 153 6	(-)	(-)
Carcinoma pulmonar de célula escamosa, células fusiformes 0/10 T1bN0M0 IA 122 6	(++)	(-)
	EXPRESIÓN DE IGF-1R	**TEJIDO NORMAL**
Carcinosarcoma pulmonar 0/6 T3N0M0 IIB 111 6	(-)	(-)
Carcinosarcoma pulmonar 0/14 T2aN0M0 IB 154 6	(+++)	(-)
	EXPRESIÓN DE IGF-1R	**TEJIDO NORMAL**
Carcinoma pulmonar neuroendocrino de células grandes 0/7 T2aN0M0 IB 112 6	(+++)	(-)
Carcinoma pulmonar neuroendocrino de células grandes 0/38 T3N0M0 IIB 133 6	(+)	(-)
	EXPRESIÓN DE IGF-1R	**TEJIDO NORMAL**
Carcinoma pulmonar de células grandes 0/9 T2aN0M0 IB 114 6	(++) to (+++)	(-)
Carcinoma pulmonar de células grandes 0/14 T1bN0M0 IA 125 6	(+)	(-)
Carcinoma pulmonar de células grandes 0/33 T2aN0M0 IB 142 6	(++)	(-)
	EXPRESIÓN DE IGF-1R	**TEJIDO NORMAL**
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, no mucinoso 7/17 T3N2M0 IIIA 107 6	(-)	(-)
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, no mucinoso 0/8 T2bN0M0 IIA 116 6	(-)	(-)
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, no mucinoso 2/24 T1aN1M0 IIA 149 6	(+)	(-)
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, mucinoso 0/8 T2aN0M0 IB 117 6	(-)	(-)
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, mucinoso 0/24 T2aN0M0 IB 124 6	(++)	(-)
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, mucinoso 0/9 T3N0M0 IIB 127 6	n/a	(-)
Carcinoma bronquioalveolar pulmonar, mucinoso 1/11 T1bN1M0 IIA 143 6	(+)	(-)

Otro estudio de la expresión IGF-1R se ha llevado a cabo en una serie de 10 muestras de cáncer de mama. Los resultados mostrados en la figura 24 demostraron que IGF-1R se expresa elevadamente en tejidos cancerosos en comparación con los tejidos normales contiguos. Los datos de tinciones de resumidos en la tabla 16 demostraron que 66% de casos analizados eran ++, ++/+++ o +++ y 22% de los casos analizados eran +++ o ++/+++.

Tabla 16

	EXPRESIÓN (tinción membranosa)	TEJIDO NORMAL
Carcinoma canalicular infiltrante de mama T2N0M0	(+++)	(+)
Carcinoma canalicular infiltrante de mama T3N2aM0	(+)	c
Carcinoma canalicular infiltrante de mama T2N3aM0	n/a	n/a
Carcinoma canalicular infiltrante de mama T3N1aM0	(+)	(+)
Carcinoma papilar infiltrante a la mama con carcinoma de células en anillo de sello T3N1aM0 *	(++) a (+++)	(+)
Carcinoma canalicular infiltrante de mama T3N3aM0	(++)	(+)
Carcinoma mixto infiltrante canalicular y lobular de mama T3N2aM0	(++)	c

	EXPRESIÓN (tinción membranosa)	TEJIDO NORMAL
Carcinoma medular de mama T3N0M0 *	(+) a (++)	0 a (+)
Carcinoma medular atípico de mama T2N1aM0	(++)	0 a (+)
Carcinoma canalicular infiltrante de mama T2N0M0 *	(++)	0 a (+)

* Casos ilustrados

Finalmente, la sobreexpresión de IGF-1R se mostró en una serie de tumores que incluyen cabeza y cuello, vejiga urinaria y riñón (figura 25). Otra vez una elevada sobreexpresión de IGF-1R se advierte en las muestras tumorales frente a los tejidos adyacentes normales.

Considerados conjuntamente, estos resultados están de acuerdo con un enfoque de inmunoconjugado para tratar muchos tumores positivos para IGF-1R incluyendo pulmón, pecho, cabeza y cuello, vejiga urinaria y riñón.

Ejemplo 14: Definición de la constante de disociación (KD) de la unión de cinco anticuerpos anti-IGF-1R quiméricos (c208F2, c213B10, c212A11, c214F8 y c219D6) y una versión humanizada (VH3/VL3) del anticuerpo 208F2 en IGF-1R de humano recombinante soluble

Las constantes de disociación (K_D) de la unión de los anticuerpos en IGF-1R de humano soluble recombinante se definieron por la proporción entre la tasa de disociación (k_{off}) y la tasa de asociación (k_{on}). Los experimentos cinéticos se ejecutaron en un dispositivo Biacore X100 usando un circuito integrado del sensor CM5 activado por un anticuerpo monoclonal anti-Tag His de ratón. Aproximadamente 12000 RU de anticuerpos químicamente se injertan en la matriz de carboximetildextrano utilizando la química del kit de amina.

Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C con una velocidad de flujo de 30 µl/min utilizando HBS-EP+ amortiguador (GE Healthcare) como el amortiguador de dilución de la muestra y ejecución.

El esquema cinético de ciclo único se utilizó para definir los parámetros cinéticos de la unión de los anticuerpos anti-IGF-1R en IGF-1R de humano recombinante soluble capturado por su dos 10 Histidina-etiqueta C-terminales.

1- Una solución de una versión recombinante soluble de heterotetrámero IGF-1R de humano: 2α cadenas y los dominios extracelulares de 2β cadenas expresadas con un 10-His tag C-terminal adicional (R&D Systems número de catálogo 305-GR-50) se inyectaron durante un minuto en la segunda celda de flujo a una concentración de 10µg/ml. Una media de 587 RU (con una desviación estándar de 24 RU) del receptor soluble se capturó en cada uno de los 24 ciclos realizados para este estudio.

2- Después de la fase de captura, el amortiguador de ejecución se inyectó 5 veces (90 s cada inyección) o un intervalo creciente de 5 concentraciones de uno de los seis anticuerpos se inyectó (90 s cada inyección) en ambas celdas de flujo. Al final de la quinta inyección el amortiguador de ejecución se hizo pasar durante 5 minutos para definir la tasa de la disolución.

3- La superficie se generó luego con una inyección de glicina de 10 mm, amortiguador de pH 1.5 HCl durante 45 s.

La señal computadorizada corresponde a la diferencia entre respuesta de la celda de flujo 2 (con IGF-1R capturado) y la respuesta de la celda de flujo 1 (sin cualquier molécula IGF-1R).

Para cada IGF-1R la señal debida a las inyecciones el intervalo creciente de concentraciones de un anticuerpo se corrigió por la sustracción de la señal obtenida con las 5 inyecciones del amortiguador (doble referencia) ver la figura 26.

Los sensogramas resultantes se analizaron por el software Biaevaluation con un modelo 1:1.

Cuatro experimentos se ejecutaron para cada anticuerpo usando dos diferentes intervalos de concentraciones: 40, 20, 10, 5 y 2.5 nM para los dos primeros experimentos y: 24, 12, 6, 3 y 1.5 nM para los dos últimos experimentos ejecutados para cada anticuerpo.

Para los 6 anticuerpos analizados en este experimento los datos experimentales se ajustaron bien con un modelo 1:1 con valores de k_{off} significativos cuando la concentración más elevada se definió como una constante y las otras cuatro concentraciones se calculan (ver a la figura 27).

Las constantes de disociación (K_D) calculadas como la proporción: el k_{off}/k_{on} y la vida media de los complejos calculada como la proporción: $Ln(2)/k_{off}$ se representan en las figuras 28 y 29. Corresponden a la media de los cuatro experimentos independientes ejecutados para cada anticuerpo. Las barras de error corresponden a errores estándares (n=4) de los valores.

Las constantes de disociación están en el intervalo de 10 a 100 p.m. El anticuerpo c208F2 presenta la afinidad más débil (valor de la constante de disociación más elevado) para h-IGF-1R (con una K_D de aproximadamente 75 pM) y su versión humanizada es por lo menos tan adecuada como la versión quimérica (con una K_D de aproximadamente 60 pM). Los otros cuatro anticuerpos quiméricos anti-IGF-1R presentan una afinidad muy similar para hIGF1-R (con unad K_D de aproximadamente 30 pM). La diferencia de las afinidades principalmente se une a la tasa de disociación o la vida media resultante de los complejos. Con 208F2 la semivida del complejo está entre 2 y 3 horas con las versiones quimérica y humanizada (VH3/VL3). Para los otros cuatro anticuerpos quiméricos las vidas medias de medios están entre 7.0 y 9.4 h.

Estas cinéticas de disociación muy lentas están claramente ligadas a la estructura bivalente de los anticuerpos que son capaces de unirse simultáneamente a ambos de sus ramas de Fab a dos moléculas h-IGF-1R contiguas. En este caso el nivel de moléculas IGF-1R capturadas puede tener un impacto sobre la tasa de disociación. Las afinidades definidas en este estudio corresponden a las afinidades funcionales (o avideces) de los anticuerpos para un nivel de h-IGF-1R capturado de aproximadamente 600 RU. La diferencia de 3 veces de KD que se observa entre los datos mostrados anteriores (tabla 10) y los valores presentados en el ejemplo 13 se une a un cambio del nivel de la captura de hIGF-1R (600RU frente a 160 RU en el ejemplo 5).

Ejemplo 15: Definición de residuos específicos de IGF-1R de ratón que evitan la unión de c208F2 usando formas solubles de proteínas recombinantes de IGF-1R h/m quiméricas.

La unión de las formas solubles de proteínas recombinantes de IGF-1R h/m quiméricas en los experimentos del anticuerpo c208F2 se ejecutó en un dispositivo Biacore X100 usando un circuito integrado del sensor CM5 activado por un anticuerpo monoclonal anti-humano IgG Fc de ratón. Más de 10,500 RU del anticuerpo anti-Fc químicamente se injertan en la matriz de carboximetildextrano de ambas celdas de flujo usando la química del kit de la amina.

Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C con velocidad de flujo de 30 µl/min utilizando HBS-EP+ amortiguador como la solución de la dilución de la muestra y ejecución.

La instalación del experimento era como sigue:

1- Una solución de c208F2 a la concentración de 10µg/ml se inyectó durante 60 s en la segunda celda de flujo.

2- Los constructos de IGF-1R analizados corresponden a sobrenadantes concentrados del medio de cultivo diluido 10 veces en el amortiguador de ejecución. Una construcción se inyectó en cada ciclo durante 120 s con un retraso de 120 s.

3- Ambas celdas de flujo fueron regeneradas por una inyección de glicina de 10 mM, amortiguador de pH de 1.7 HCl durante 30 s.

La figura 30 muestra la superposición de dos ciclos. Los sobrenadantes de h-IGF-1R y m-IGF-1R se inyectaron durante los primer y segundo ciclos respectivamente. Este experimento muestra claramente la incapacidad de m-IGF-1R para unirse con el anticuerpo c208F2 las ubicaciones usadas para la determinación del nivel de captura de c208F2 y del nivel de unión de IGF-1R se indica por flechas de cabezas dobles.

Los dominios extracelulares de IGFR (sin el péptido de señalización) están compuestos por 805 y 806 aminoácidos para la secuencia de humano y de ratón respectivamente.

Son idénticos 869 residuos (96%) en ambas estructuras. Son diferentes 37 residuos de la secuencia de ratón respecto a la secuencia de humano correspondiente. Una diferencia corresponde a una separación.

Como se muestra en la figura 31, de entre los 7 constructos quiméricos 4 analizados (C1 (SEC ID nº 83), C4 (SEC ID nº 86), C7 (SEC ID nº 88) y C8 (SEC ID nº 89)) se unen así como h-IGF-1R a c208F2, 3 constructos (C2 (SEC ID nº 84), C3 (SEC ID nº 85) y C6 (SEC ID nº 87)) como mIGF-1R (SEC ID nº 91) no se unen a c208F2.

La unión de C1 y la falta de unión de C2 sugieren que los residuos específicos de ratón que bloquean la unión de c208F2 se ubican en la mitad N-terminal de la proteína. Por tanto los once últimos aminoácidos de ratón específicos ubicados en la mitad C-terminal no tienen influencia en la unión de c208F2.

La falta de unión de C3 demuestra una contribución principal de un residuo específico de ratón Arg en lugar de His en la ubicación 494. Este resultado se confirma mediante la falta de unión de C6 que contiene dos residuos específicos de ratón: His494> Arg y Ser501> Trp.

La unión de C4 sugiere que el único residuo específico de ratón Trp en la ubicación 501 de este IGF-1R quimérico no es responsable de la falta de unión de C2 y C6.

La unión de C7 sugiere que ninguno de los 17 residuos específicos de ratón presentes en este constructo presentan cualquier peso en el bloqueo de la unión de c208F2.

Igualmente, la unión de C8 excluye los otros 4 residuos específicos de ratón.

El mutante C12 de IGF1R de humano que presenta los tres residuos de ratón en el dominio L1 es decir Phe en la posición 28 en lugar de Tyr, Ile en la posición 125 en lugar de Val y Leu en la posición 156 en lugar de Met une c208F2 a una constante de disociación subnanomolar. Este experimento confirma que el dominio L1 no está implicado en la unión del anticuerpo o por lo menos que las 3 posiciones que diferenciaron las secuencias de humano y de ratón no son responsables de la ausencia de la unión del anticuerpo en la forma murina del IGF1R.

Como se muestra en la figura 33, hz208F2 no es capaz de unirse a 120 RU del mutante C29 (Asp491> Ala) de forma soluble del h-IGF1R capturado en un circuito integrado sensor CM5 por su 6His tag C-terminal (diamantes blancos) mientras que la misma solución del anticuerpo claramente se une (diamantes negros) a 170 RU de la forma de tipo silvestre del receptor soluble. Como el His 494, el ASP 491 es crítico para la afinidad de hz208F2 para IGF1R. Los datos cristalográficos muestran que ambos residuos se exponen a la superficie del receptor en el dominio FnR3.

En conjunto, estos resultados demostraron que hz208F2 se une al dominio FnR3 de IGF-1R y que el epítopo reconocido por este anticuerpo contiene His 494 y ASP 491 que son cruciales para la unión del anticuerpo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> NUEVO ANTICUERPO IGF-1R Y SU UTILIZACIÓN COMO UN VEHÍCULO DE DIRECCIONAMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 367603D33596

<150> US61984160
<151> 2014-04-25

<160> 92

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-H1 de consenso

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Thr se puede reemplazar por Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Tyr se puede reemplazar por Phe

<400> 1
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-H2 de consenso

<400> 2
Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-H3 de consenso

<400> 3
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Consenso CDR-L1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Ser se puede reemplazar por Asn

<400> 4
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
1 5

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L2 de consenso

<400> 5
Tyr Thr Ser
1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L3 de consenso

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Thr se puede reemplazar por Ala

<400> 6
Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-H1

<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-H1

<400> 8
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Phe
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L1

<400> 9
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L1

<400> 10
Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L3

<400> 11
Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L3

<400> 12
Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c208F2, cadena pesada, VH

<400> 13

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

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

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

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

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c212A11, cadena pesada, VH

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c214F8, cadena pesada, VH

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, cadena pesada, VH

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c213B10, cadena pesada, VH

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c208F2, cadena ligera, VL

<400> 18

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

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

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c212A11, cadena ligera, VL

<400> 19

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

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

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c214F8, cadena ligera, VL

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, cadena ligera, VL

<400> 21

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

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

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c213B10, cadena ligera, VL

<400> 22

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

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

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 23
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c208F2, cadena pesada, cadena completa

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
```

```
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 24
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c212A11, cadena pesada, cadena completa

<400> 24

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
```

```
    50                  55                  60

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 25
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c214F8, cadena pesada, cadena completa

<400> 25

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
```

```
    50                  55                  60

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 26
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, cadena pesada, cadena completa

<400> 26

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
```

```
    50                  55                  60

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly

<210> 27
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c213B10, cadena pesada, cadena completa

<400> 27
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

```
    50                  55                  60

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 28
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c208F2, cadena ligera, cadena completa

<400> 28

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
```

```
    50                  55                  60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 29
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c212A11, cadena ligera, cadena completa

<400> 29

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c214F8, cadena ligera, cadena completa

<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, cadena ligera, cadena completa

<400> 31

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c213B10, cadena ligera, cadena completa

<400> 32

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
```

```
1               5                   10                  15

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

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.1) cadena pesada, VH

<400> 33

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

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

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

Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 3), VH

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35

<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 1), VL

<400> 35

```
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 Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg 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 Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.3), VL

<400> 36

```
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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 1), cadena pesada, cadena completa

<400> 37

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

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

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

Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 38
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.3), cadena pesada cadena completa

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 39
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 1), cadena ligera, cadena completa

<400> 39

```
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 Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg 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 Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
```

```
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.3), cadena ligera, cadena completa

<400> 40

```
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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

```
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.2) cadena pesada, VH

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Met se puede reemplazar por Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Ile se puede reemplazar por Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Tyr se puede reemplazar por His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Lys se puede reemplazar por Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Leu se puede reemplazar por Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> Trp se puede reemplazar por Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> Lys se puede reemplazar por Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Asn se puede reemplazar por Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (62)..(62)
<223> Glu se puede reemplazar por Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(70)
<223> Leu se puede reemplazar por Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(72)
<223> Ala se puede reemplazar por Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (74)..(74)
<223> Lys se puede reemplazar por Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Ser se puede reemplazar por Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Asn se puede reemplazar por Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> Ala se puede reemplazar por Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> Phe se puede reemplazar por Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95)..(95)
<223> Phe se puede reemplazar por Tyr

<400> 41

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 2), cadena ligera, VL

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Ser se puede reemplazar por Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
<223> Arg se puede reemplazar por Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
<223> His se puede reemplazar por Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (65)..(65)
<223> Arg se puede reemplazar por Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (71)..(71)
<223> Tyr se puede reemplazar por Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(72)
<223> Ser se puede reemplazar por Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Asn se puede reemplazar por Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Phe se puede reemplazar por Tyr

<400> 42

```
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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 329
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Dominio constante (VH) IgG1

<400> 43

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
```

```
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                325
```

<210> 44
<211> 326
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Dominio constante (VH) IgG4 (S228P)

<400> 44

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140
```

```
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
                325
```

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Dominio kappa (VL)

<400> 45

```
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1               5                   10                  15
```

```
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
            20                  25                  30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
        35                  40                  45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50                  55                  60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85                  90                  95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 46
<211> 98
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Línea germinal humana IGHV1-46*01

<400> 46

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg
```

<210> 47
<211> 95
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Línea germinal humana IGKV1-39*01

<400> 47

```
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 Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg 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 Ser Tyr Ser Thr Pro
                85                  90                  95
```

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Línea germinal humana IGHJ4*01

<400> 48

```
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Línea germinal humana IGKJ4*01

<400> 49

```
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1               5                   10
```

<210> 50
<211> 1367
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IGF-1R (humano)

<400> 50

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                  10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220
```

```
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480
```

```
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
        595                 600                 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
    610                 615                 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
                645                 650                 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
            660                 665                 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
        675                 680                 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
    690                 695                 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705                 710                 715                 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
```

```
                725                 730                 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
            740                 745                 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
        755                 760                 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
    770                 775                 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785                 790                 795                 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
                805                 810                 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
            820                 825                 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
        835                 840                 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
    850                 855                 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865                 870                 875                 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
                885                 890                 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
            900                 905                 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
        915                 920                 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
    930                 935                 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945                 950                 955                 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
                965                 970                 975
```

```
Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
            980                 985                 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr  Met Ser Arg Glu Leu  Gly Gln Gly
        995                 1000                1005

Ser Phe  Gly Met Val Tyr Glu  Gly Val Ala Lys Gly  Val Val Lys
    1010                1015                1020

Asp Glu  Pro Glu Thr Arg Val  Ala Ile Lys Thr Val  Asn Glu Ala
    1025                1030                1035

Ala Ser  Met Arg Glu Arg Ile  Glu Phe Leu Asn Glu  Ala Ser Val
    1040                1045                1050

Met Lys  Glu Phe Asn Cys His  His Val Val Arg Leu  Leu Gly Val
    1055                1060                1065

Val Ser  Gln Gly Gln Pro Thr  Leu Val Ile Met Glu  Leu Met Thr
    1070                1075                1080

Arg Gly  Asp Leu Lys Ser Tyr  Leu Arg Ser Leu Arg  Pro Glu Met
    1085                1090                1095

Glu Asn  Asn Pro Val Leu Ala  Pro Pro Ser Leu Ser  Lys Met Ile
    1100                1105                1110

Gln Met  Ala Gly Glu Ile Ala  Asp Gly Met Ala Tyr  Leu Asn Ala
    1115                1120                1125

Asn Lys  Phe Val His Arg Asp  Leu Ala Ala Arg Asn  Cys Met Val
    1130                1135                1140

Ala Glu  Asp Phe Thr Val Lys  Ile Gly Asp Phe Gly  Met Thr Arg
    1145                1150                1155

Asp Ile  Tyr Glu Thr Asp Tyr  Tyr Arg Lys Gly Gly  Lys Gly Leu
    1160                1165                1170

Leu Pro  Val Arg Trp Met Ser  Pro Glu Ser Leu Lys  Asp Gly Val
    1175                1180                1185

Phe Thr  Thr Tyr Ser Asp Val  Trp Ser Phe Gly Val  Val Leu Trp
    1190                1195                1200

Glu Ile  Ala Thr Leu Ala Glu  Gln Pro Tyr Gln Gly  Leu Ser Asn
    1205                1210                1215
```

```
Glu Gln  Val Leu Arg Phe Val  Met Glu Gly Gly Leu  Leu Asp Lys
    1220                 1225                 1230

Pro Asp  Asn Cys Pro Asp Met  Leu Phe Glu Leu Met  Arg Met Cys
    1235                 1240                 1245

Trp Gln  Tyr Asn Pro Lys Met  Arg Pro Ser Phe Leu  Glu Ile Ile
    1250                 1255                 1260

Ser Ser  Ile Lys Glu Glu Met  Glu Pro Gly Phe Arg  Glu Val Ser
    1265                 1270                 1275

Phe Tyr  Tyr Ser Glu Glu Asn  Lys Leu Pro Glu Pro  Glu Glu Leu
    1280                 1285                 1290

Asp Leu  Glu Pro Glu Asn Met  Glu Ser Val Pro Leu  Asp Pro Ser
    1295                 1300                 1305

Ala Ser  Ser Ser Ser Leu Pro  Leu Pro Asp Arg His  Ser Gly His
    1310                 1315                 1320

Lys Ala  Glu Asn Gly Pro Gly  Pro Gly Val Leu Val  Leu Arg Ala
    1325                 1330                 1335

Ser Phe  Asp Glu Arg Gln Pro  Tyr Ala His Met Asn  Gly Gly Arg
    1340                 1345                 1350

Lys Asn  Glu Arg Ala Leu Pro  Leu Pro Gln Ser Ser  Thr Cys
    1355                 1360                 1365
```

<210> 51
<211> 932
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IGF-1R ECD (humano)

<400> 51

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                  10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45
```

```
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300
```

```
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560
```

```
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
        595                 600                 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
    610                 615                 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
                645                 650                 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
            660                 665                 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
        675                 680                 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
    690                 695                 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705                 710                 715                 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
                725                 730                 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
            740                 745                 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
        755                 760                 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
    770                 775                 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785                 790                 795                 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
```

805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925

Gly Tyr Glu Asn
930

<210> 52
<211> 512
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IGF-1R ECD N-terminal (humano)

<400> 52
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

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

```
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
```

```
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510
```

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> tetrapéptido (ligador)

<400> 53
Gly Phe Leu Gly
1

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> tetrapéptido (ligador)

<400> 54
Ala Leu Ala Leu
1

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> tetrapéptido (ligador)

<400> 55
Pro Val Gly Val Val
1 5

<210> 56
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H037, VH

<400> 56
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena ligera L018, VL

<400> 57

```
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 Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

<210> 58
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H037 cadena completa

<400> 58

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

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

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

```
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
```

```
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 59
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena ligera L018 cadena completa

<400> 59

```
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 Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

```
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena ligera L021, VL

<400> 60

```
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 Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30
```

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

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

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

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

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

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena ligera L021 cadena completa

<400> 61

```
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 Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
```

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 62
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H047, VH

<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 63
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> hz208F2 cadena pesada H047 cadena completa

<400> 63

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 64
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H049, VH

<400> 64

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 65
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H049 cadena completa

<400> 65

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 66
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H051, VH

<400> 66

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H051 cadena completa

<400> 67
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

```
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 68
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H052, VH

<400> 68

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                 120
```

<210> 69
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H052 cadena completa

<400> 69

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 70
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H057, VH

<400> 70

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 71
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H057 cadena completa

<400> 71

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

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

```
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 72
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H068, VH

<400> 72

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 73
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H068 cadena completa

<400> 73

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
```

```
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 74
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H070, VH

<400> 74

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                 120
```

<210> 75
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H070 cadena completa

<400> 75

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 76
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H071, VH

<400> 76

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 77
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H071 cadena completa

<400> 77

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 78
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H076, VH

<400> 78

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H076 cadena completa

<400> 79
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

```
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 80
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H077, VH

<400> 80

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                 120
```

<210> 81
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 cadena pesada H077 cadena completa

<400> 81

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

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

Gly
```

<210> 82
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> N-terminal de IGF-1R ECD mutado con arginina en la posición 494

<400> 82

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                  10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205
```

```
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
```

```
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510
```

<210> 83
<211> 941
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C1 fragmento con His Tag

<400> 83

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                   10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160
```

```
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
```

```
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560

Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
        595                 600                 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
    610                 615                 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
                645                 650                 655
```

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Arg Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys Thr
915 920 925

Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His
930 935 940

<210> 84
<211> 939
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> C2 fragmento con His Tag

<400> 84

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                   10                  15

Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175
```

```
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225                 230                 235                 240

Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
                325                 330                 335

Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
            340                 345                 350

Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
        355                 360                 365

Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
    370                 375                 380

Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385                 390                 395                 400

Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
                405                 410                 415

Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
            420                 425                 430
```

```
Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
        435                 440                 445

Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
    450                 455                 460

Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465                 470                 475                 480

Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe
                485                 490                 495

Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
            500                 505                 510

Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
        515                 520                 525

Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
    530                 535                 540

Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560

Lys Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
                565                 570                 575

Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
            580                 585                 590

Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
        595                 600                 605

Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
    610                 615                 620

Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly
625                 630                 635                 640

Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
                645                 650                 655

Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
            660                 665                 670

Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
        675                 680                 685
```

```
Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
    690                 695                 700

Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705                 710                 715                 720

Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
                725                 730                 735

Glu Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
            740                 745                 750

Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
        755                 760                 765

Pro Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
    770                 775                 780

Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785                 790                 795                 800

Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
                805                 810                 815

Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
            820                 825                 830

Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
        835                 840                 845

Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
    850                 855                 860

Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865                 870                 875                 880

Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
                885                 890                 895

Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
            900                 905                 910

Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys
        915                 920                 925

Thr Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
    930                 935
```

<210> 85
<211> 938
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C3 fragmento con His Tag

<400> 85

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                  10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205
```

```
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
```

```
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
        595                 600                 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
    610                 615                 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
                645                 650                 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
            660                 665                 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
        675                 680                 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
    690                 695                 700
```

```
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705                 710                 715                 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
                725                 730                 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
            740                 745                 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
        755                 760                 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
    770                 775                 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785                 790                 795                 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
                805                 810                 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
            820                 825                 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
        835                 840                 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
    850                 855                 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865                 870                 875                 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
                885                 890                 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
            900                 905                 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
        915                 920                 925

Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
    930                 935
```

<210> 86
<211> 938
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C4 fragmento con His Tag

<400> 86

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                  10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220
```

```
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480
```

```
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
        595                 600                 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
    610                 615                 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
                645                 650                 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
            660                 665                 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
        675                 680                 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
    690                 695                 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705                 710                 715                 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
                725                 730                 735
```

```
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
            740                 745                 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
        755                 760                 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
    770                 775                 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785                 790                 795                 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
                805                 810                 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
            820                 825                 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
        835                 840                 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
    850                 855                 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865                 870                 875                 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
                885                 890                 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
            900                 905                 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
        915                 920                 925

Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
    930                 935
```

<210> 87
<211> 938
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C6 fragmento con His Tag

<400> 87

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                   10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255
```

```
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
```

```
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
        595                 600                 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
    610                 615                 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
                645                 650                 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
            660                 665                 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
        675                 680                 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
    690                 695                 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705                 710                 715                 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
                725                 730                 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
            740                 745                 750
```

```
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
        755                 760                 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
    770                 775                 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785                 790                 795                 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
                805                 810                 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
            820                 825                 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
        835                 840                 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
    850                 855                 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865                 870                 875                 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
                885                 890                 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
            900                 905                 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
        915                 920                 925

Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
    930                 935
```

<210> 88
<211> 939
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C7 fragmento con His Tag

<400> 88

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                  10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
```

```
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225                 230                 235                 240

Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270
```

```
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
                325                 330                 335

Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
            340                 345                 350

Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
        355                 360                 365

Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
    370                 375                 380

Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385                 390                 395                 400

Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
                405                 410                 415

Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
            420                 425                 430

Trp Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr
        435                 440                 445

Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
    450                 455                 460

Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465                 470                 475                 480

Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe
                485                 490                 495

Thr Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
            500                 505                 510

Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
        515                 520                 525
```

```
Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
    530                 535                 540

Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560

Lys Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
                565                 570                 575

Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
            580                 585                 590

Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
        595                 600                 605

Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
    610                 615                 620

Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly
625                 630                 635                 640

Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
                645                 650                 655

Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
            660                 665                 670

Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
        675                 680                 685

Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
    690                 695                 700

Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705                 710                 715                 720

Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
                725                 730                 735

Glu Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
            740                 745                 750

Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
        755                 760                 765

Pro Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
    770                 775                 780
```

```
Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785                 790                 795                 800

Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
                805                 810                 815

Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
            820                 825                 830

Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
        835                 840                 845

Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
    850                 855                 860

Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865                 870                 875                 880

Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
                885                 890                 895

Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
            900                 905                 910

Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys
        915                 920                 925

Thr Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
    930                 935
```

<210> 89
<211> 938
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C8 fragmento con His Tag

<400> 89

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                   10                  15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45
```

```
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300
```

```
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
```

545 550 555 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

```
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
                805                 810                 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
            820                 825                 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
        835                 840                 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
    850                 855                 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865                 870                 875                 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
                885                 890                 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
            900                 905                 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
        915                 920                 925

Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
    930                 935
```

<210> 90
<211> 942
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C9 fragmento con His Tag

<400> 90

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                   10                  15

Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
    50                  55                  60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
```

65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225 230 235 240

Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

```
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
                325                 330                 335

Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
            340                 345                 350

Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
        355                 360                 365

Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
    370                 375                 380

Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385                 390                 395                 400

Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
                405                 410                 415

Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
            420                 425                 430

Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
        435                 440                 445

Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
    450                 455                 460

Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465                 470                 475                 480

Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe
                485                 490                 495

Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
            500                 505                 510

Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
        515                 520                 525

Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
    530                 535                 540

Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560

Lys Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
                565                 570                 575
```

```
Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
            580                 585                 590

Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
        595                 600                 605

Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
    610                 615                 620

Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly
625                 630                 635                 640

Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
                645                 650                 655

Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
            660                 665                 670

Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
        675                 680                 685

Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
    690                 695                 700

Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705                 710                 715                 720

Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
                725                 730                 735

Glu Arg Arg Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
            740                 745                 750

Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
        755                 760                 765

Pro Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
    770                 775                 780

Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785                 790                 795                 800

Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
                805                 810                 815

Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
            820                 825                 830
```

```
Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
         835                 840                 845

Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
     850                 855                 860

Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865                 870                 875                 880

Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
                885                 890                 895

Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
            900                 905                 910

Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys
         915                 920                 925

Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His
     930                 935                 940
```

<210> 91
<211> 942
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IGF-1R (murino), dominio extracelular con His Tag

<400> 91

```
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1               5                   10                  15

Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
            20                  25                  30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
         35                  40                  45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
     50                  55                  60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
                85                  90                  95
```

```
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225                 230                 235                 240

Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
                325                 330                 335

Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
            340                 345                 350
```

```
Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
        355                 360                 365

Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
    370                 375                 380

Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385                 390                 395                 400

Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
                405                 410                 415

Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
            420                 425                 430

Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
        435                 440                 445

Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
    450                 455                 460

Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465                 470                 475                 480

Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe
                485                 490                 495

Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
            500                 505                 510

Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
        515                 520                 525

Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
    530                 535                 540

Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560

Lys Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
                565                 570                 575

Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
            580                 585                 590

Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
```

595 600 605

Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
610 615 620

Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly
625 630 635 640

Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
645 650 655

Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
660 665 670

Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
675 680 685

Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
690 695 700

Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705 710 715 720

Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
725 730 735

Glu Arg Arg Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
740 745 750

Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
755 760 765

Pro Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
770 775 780

Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785 790 795 800

Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
805 810 815

Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
820 825 830

Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
835 840 845

Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
850 855 860

Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865 870 875 880

Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
885 890 895

Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
900 905 910

Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys
915 920 925

Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His
930 935 940

<210> 92
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> N-terminal de IGF-1R ECD mutada con alanina en posición 491

<400> 92
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile

```
        115                 120                 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365
```

```
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Ala Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510
```

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal internalizante o fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, que se une al receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina humano (IGF-1R) de SEC ID nº 52 y se internaliza siguiendo a su unión a IGF-1R, y que no se une a un IGF-1R de SEC ID nº 82 y/o SEC ID nº 92,

comprendiendo dicho anticuerpo:

- las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3 y
- las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11,

en el que dichas CDR son como se define mediante IMGT.

2. Anticuerpo monoclonal internalizante o fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, según la reivindicación 1, en el que el epítopo de dicho anticuerpo monoclonal internalizante comprende un residuo de histidina en la posición 494 de SEC ID nº 52 y/o un residuo de ácido aspártico en la posición 491 de SEC ID nº 52.

3. Anticuerpo monoclonal internalizante o fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, según la reivindicación 2, en el que dicho epítopo comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 8 aminoácidos.

4. Anticuerpo monoclonal internalizante o fragmento de unión a IGF-1R internalizante del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuyo porcentaje de internalización que sigue a su unión a IGF-1R es de por lo menos 40%.

5. Anticuerpo monoclonal internalizante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

6. Anticuerpo internalizante según la reivindicación 5, siendo dicho anticuerpo seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 13 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 13 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11; y

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 18 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 18 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3.

7. Anticuerpo internalizante según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicho anticuerpo comprende o consiste en una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 23 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 28.

8. Anticuerpo internalizante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

9. Anticuerpo internalizante según la reivindicación 8, comprendiendo dicho anticuerpo:

a) una cadena pesada que presenta CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3, respectivamente, y FR1, FR2 y FR3 derivadas de la línea germinal humana IGHV1-46*01 (SEC ID nº 46), y FR4 derivada de la línea germinal humana IGHJ4*01 (SEC ID nº 48); y

b) una cadena ligera que presenta CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11, respectivamente, y FR1, FR2 y FR3 derivadas de la línea germinal humana IGKV1-39*01 (SEC ID nº 47), y FR4 derivada de la línea germinal humana IGKJ4*01 (SEC ID nº 49).

10. Anticuerpo internalizante según la reivindicación 9, siendo dicho anticuerpo seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 33 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 33 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11;

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 34 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 34 y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre

SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80; y las tres CDR de cadena ligera de las secuencias SEC ID nº 9, 5 y 11.

11. Anticuerpo internalizante según la reivindicación 9, siendo dicho anticuerpo seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 35 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 35 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3;

b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 36 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 36 y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 57 y 60 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 57 o 60; y las tres CDR de cadena pesada de las secuencias SEC ID nº 7, 2 y 3.

12. Anticuerpo internalizante según la reivindicación 9, siendo dicho anticuerpo seleccionado de entre:

a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 37 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 37 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 39 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 39;

b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 38 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 38 y una cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 40 o cualquier secuencia que muestre una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 40; y

c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 y 80, o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80, y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 57 y 60 o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80% con SEC ID nº 57 o 60.

13. Anticuerpo internalizante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, siendo dicho anticuerpo producido por el hibridoma I-4757 depositado en la CNCM, Institut Pasteur Francia el 30 de mayo de 2013.

14. Hibridoma murino I-4757 depositado en la CNCM, Institut Pasteur Francia el 30 de mayo de 2013.

15. Anticuerpo monoclonal internalizante, o fragmento de unión al antígeno internalizante del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la utilización como medicamento para tratar un cáncer que expresa IGF-1R, en el que dicho anticuerpo está suministrando un agente citotóxico en un sitio diana hospedador, consistiendo dicho sitio diana hospedador en un epítopo localizado en el dominio extracelular de la proteína IGF-1R, preferentemente el dominio extracelular de la proteína IGF-1R humana (SEC ID nº 51), más preferentemente el extremo N-terminal del dominio extracelular de la proteína IGF-1R humana (SEC ID nº 52), o cualquier secuencia variante natural del mismo.

16. Conjugado anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo monoclonal internalizante, o un fragmento de unión al antígeno internalizante del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, conjugado a un agente citotóxico.

17. Conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 16, para la utilización como un medicamento.

18. Conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 16 para la utilización como un medicamento para tratar un cáncer que expresa IGF-1R.

19. Composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 16 y por lo menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 para la utilización como medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa IGF-1R.

21. Conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 16 o composición farmacéutica según la reivindicación 19 para la utilización como medicamento para suministrar un fármaco o un medicamento a una célula cancerosa que expresa IGF-1R en un sujeto.

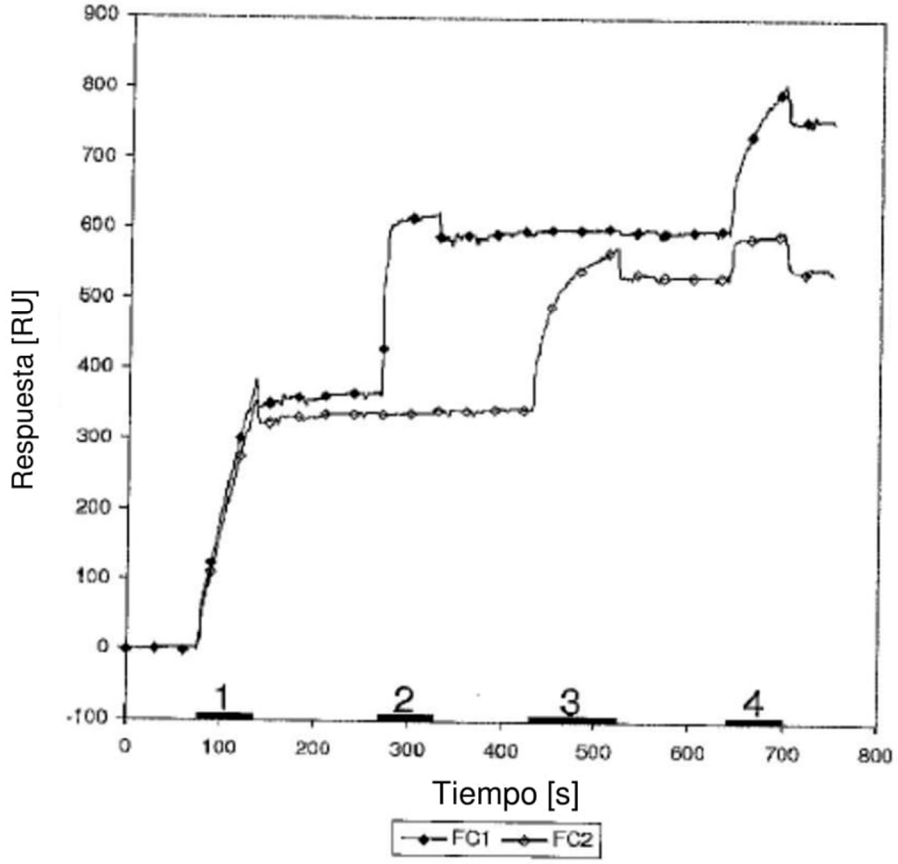


FIGURA 1

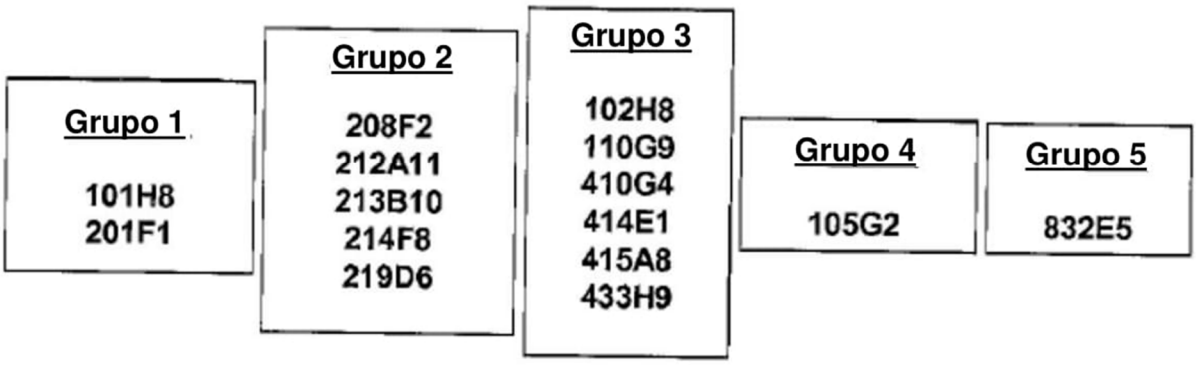


FIGURA 2

FIGURA 3A

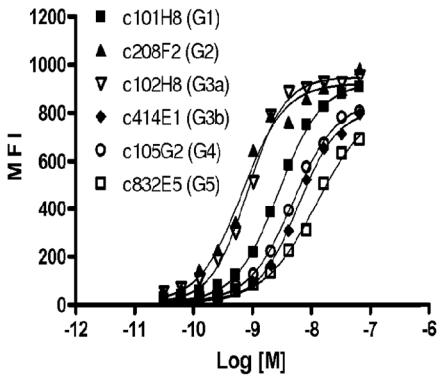


FIGURA 3B

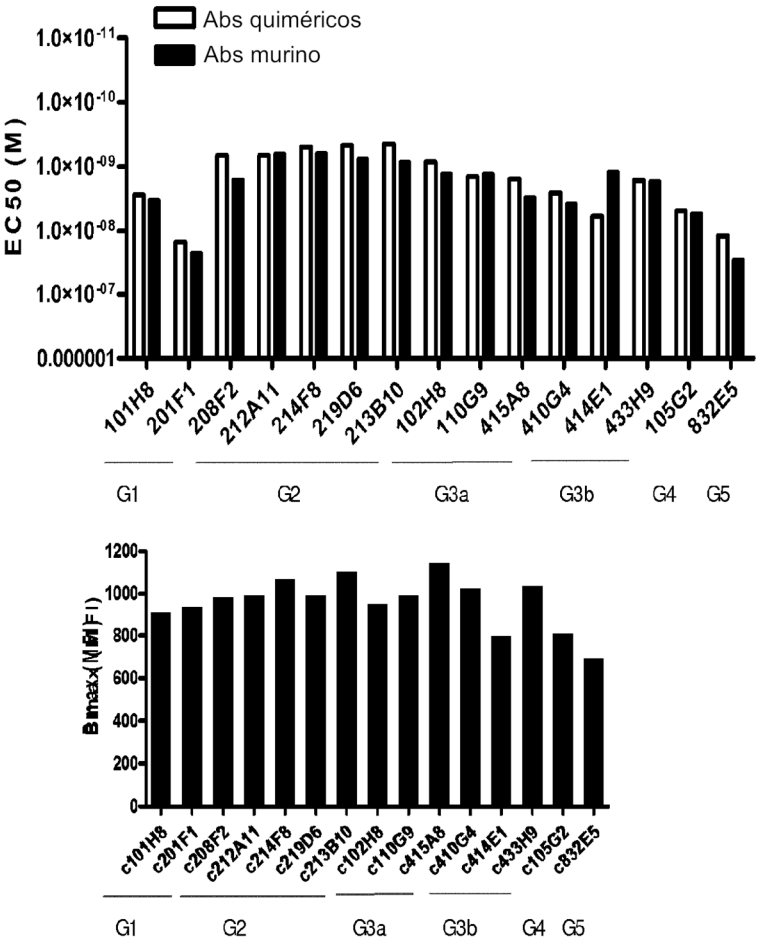


FIGURA 3C

FIGURAS 3A-3C

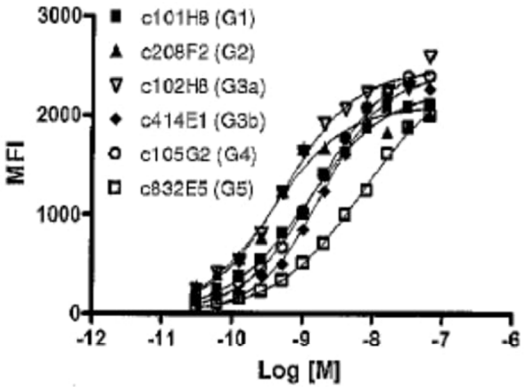


FIGURA 4A

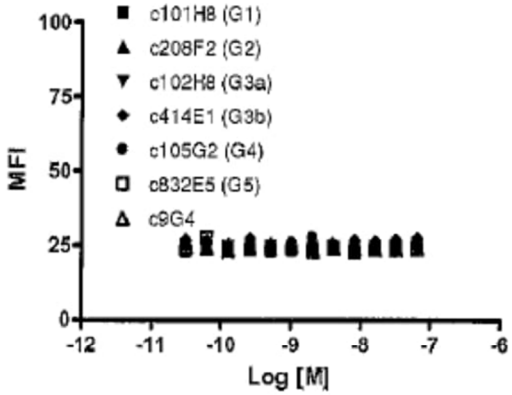


FIGURA 4B

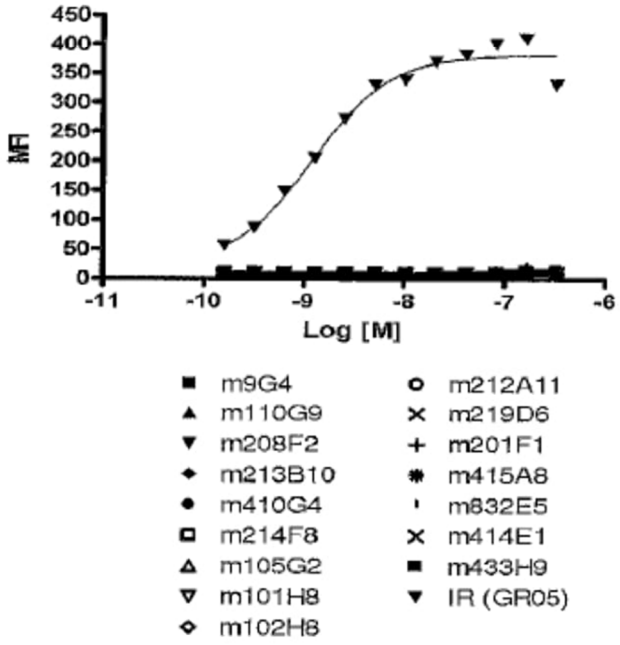


FIGURA 5A

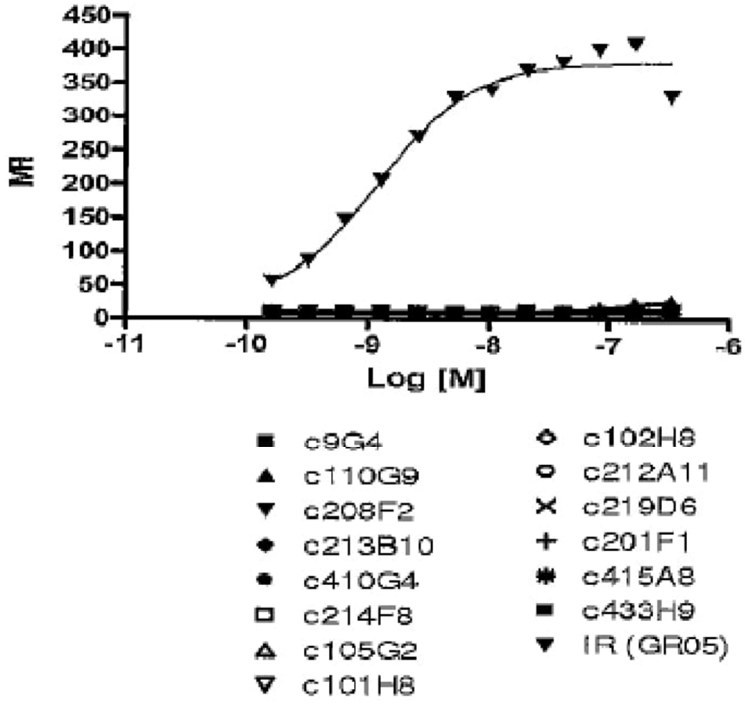


FIGURA 5B

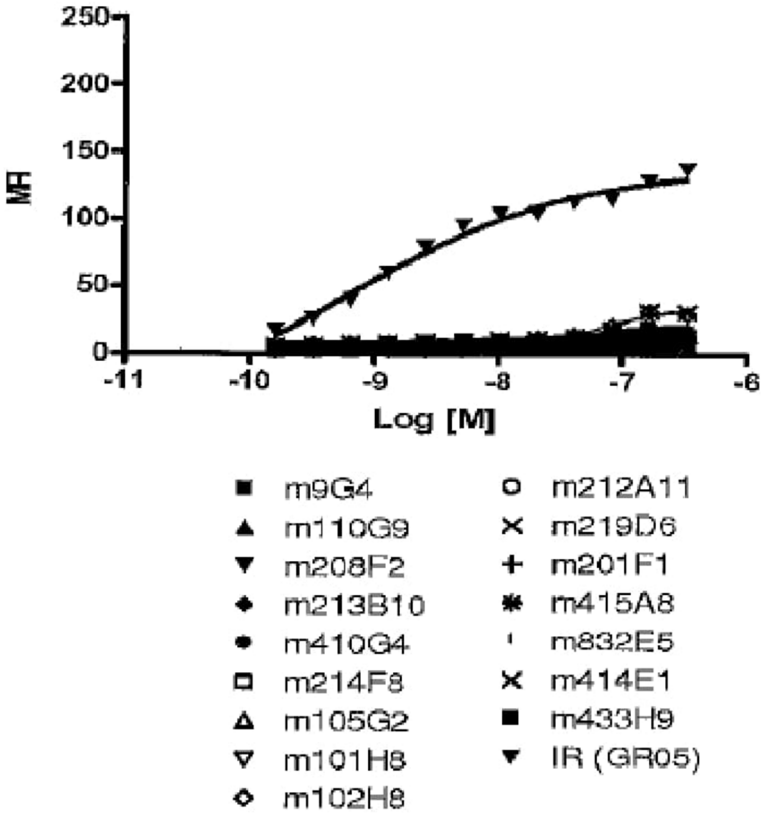


FIGURA 6

FIGURA 7A

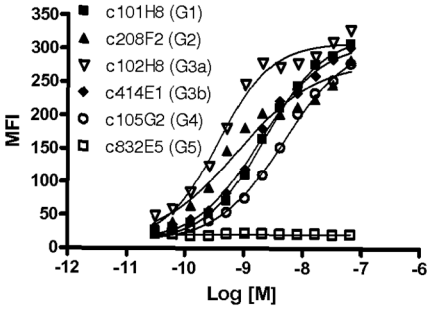


FIGURA 7B

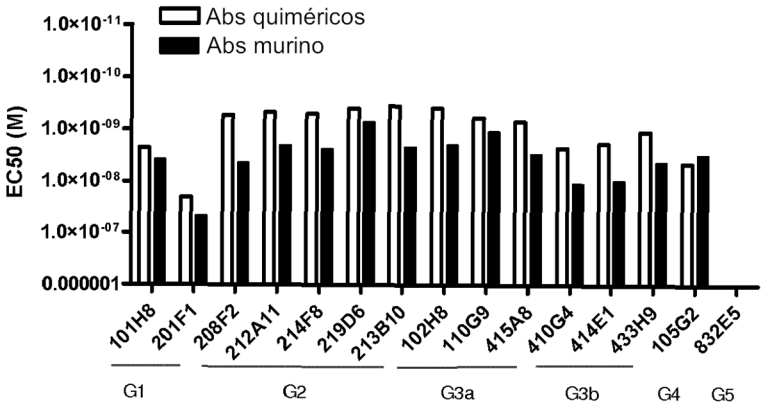
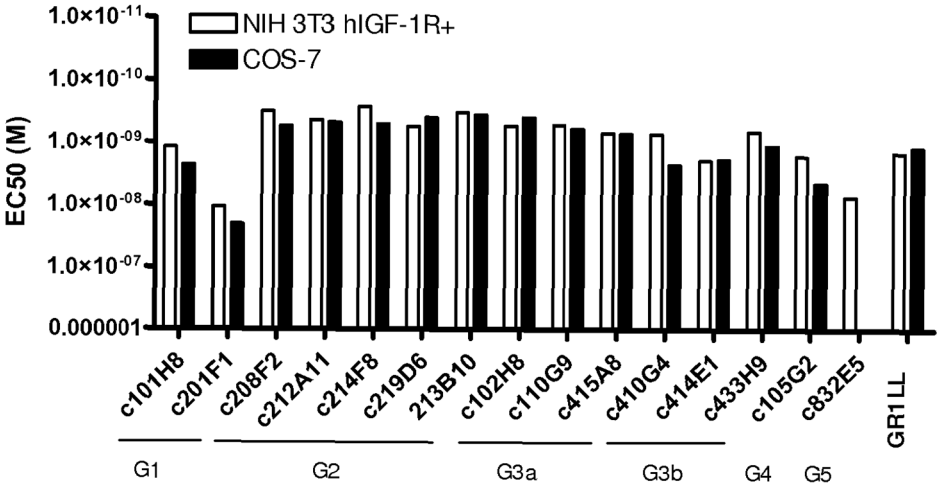


FIGURA 7C



FIGURAS 7A-7C

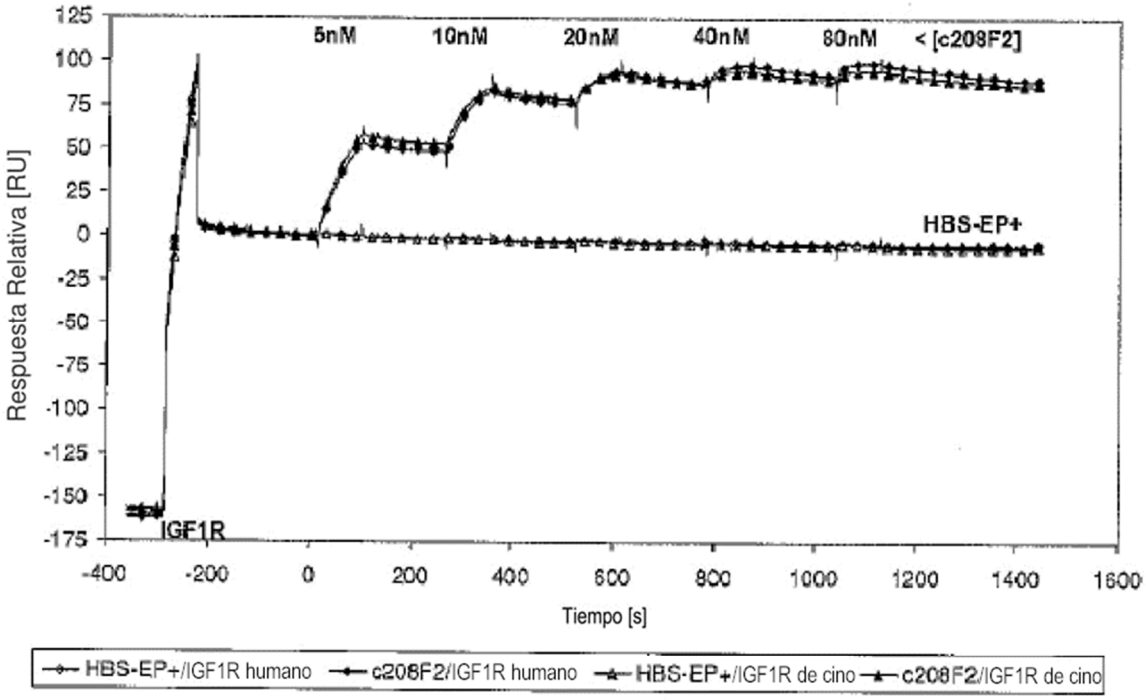


FIGURA 8

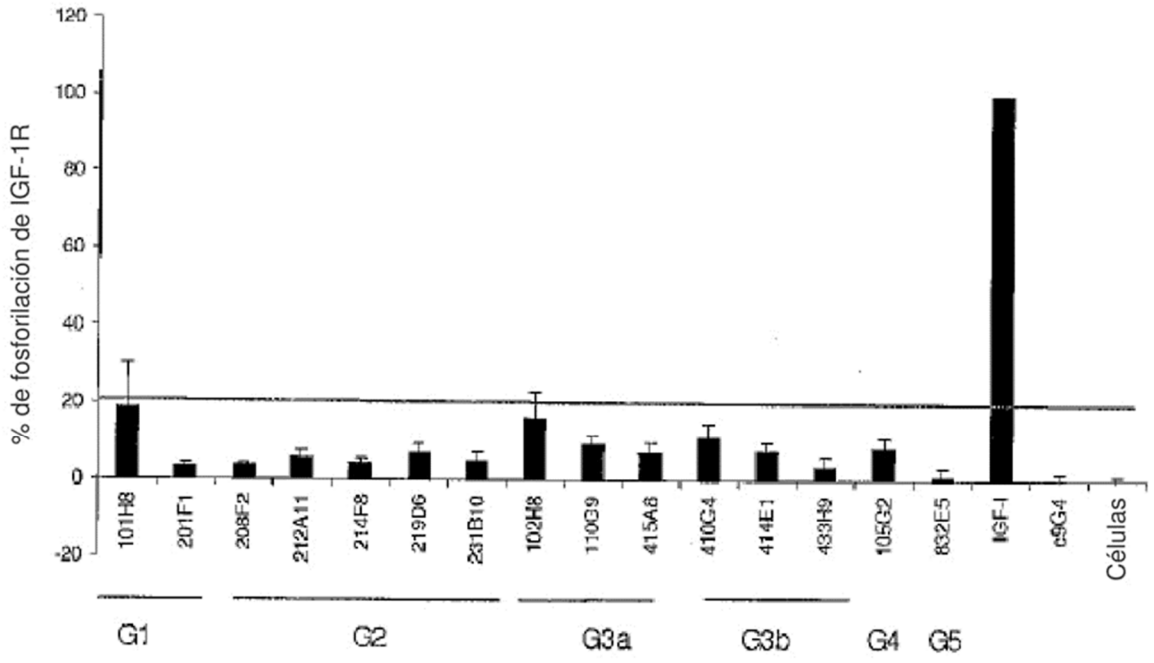


FIGURA 9

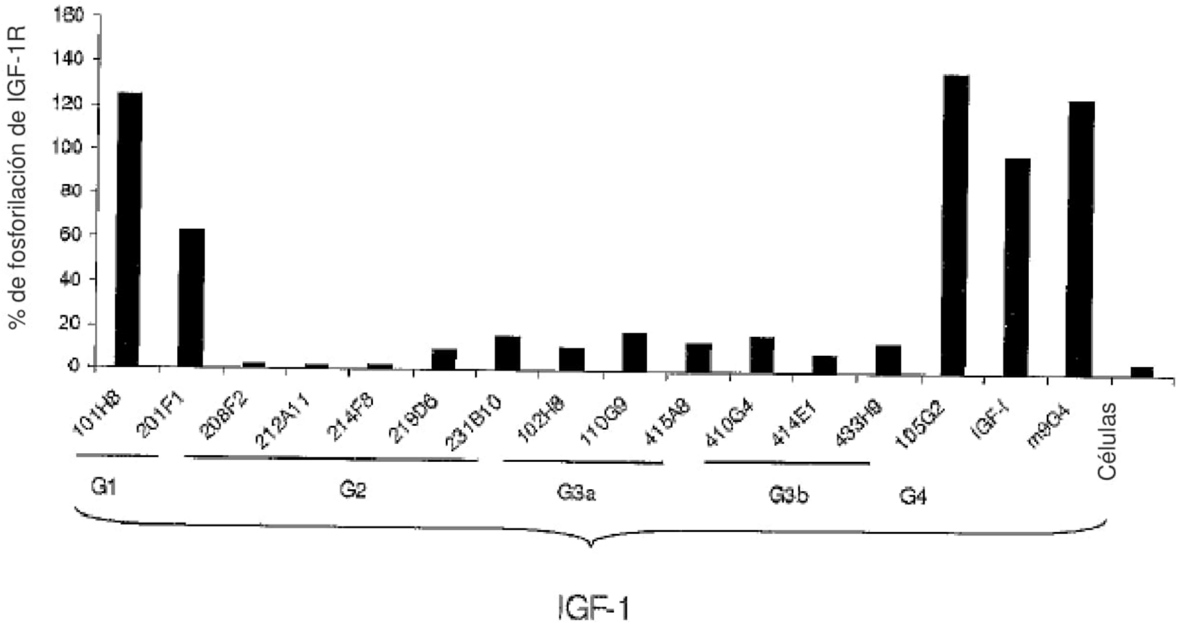

% de fosforilación de IGF-1R
160
140
120
100
80
60
40
20
0
101H8
201F1
208F2
212A11
214F8
219D6
231B10
102H8
110G9
415A8
410G4
414E1
433H8
105G2
IGF-1
m9G4
Células
G1
G2
G3a
G3b
G4
IGF-1

FIGURA 10

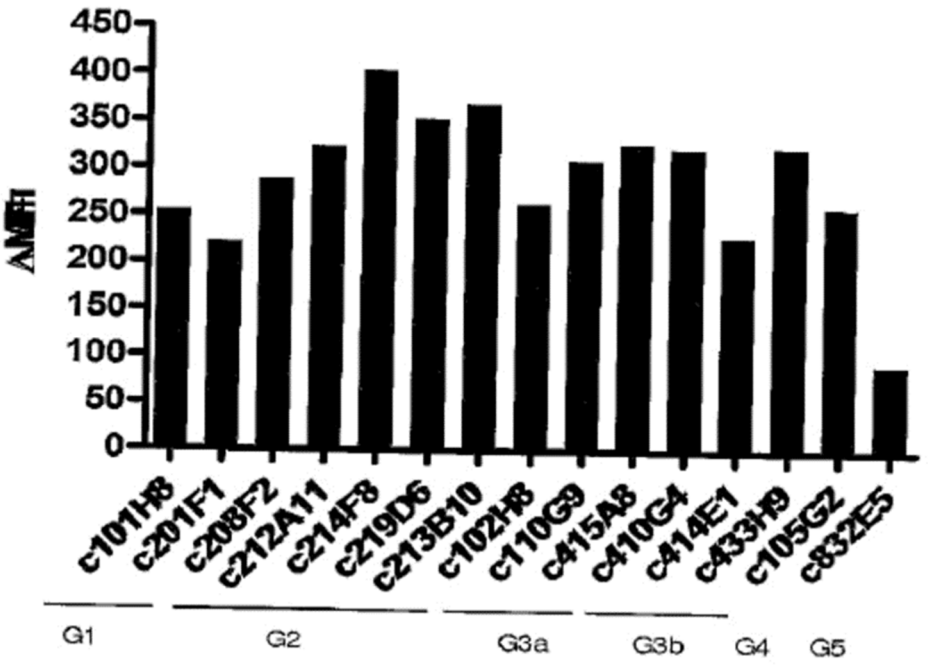


FIGURA 11

FIGURA 12A

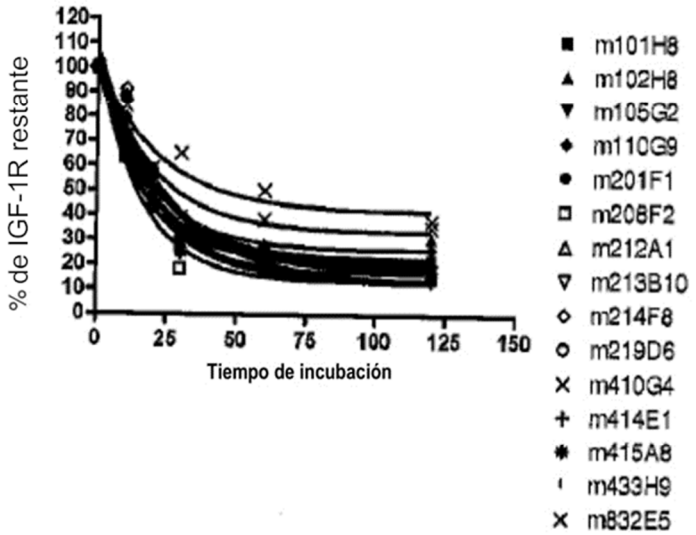


FIGURA 12B

	Abs	vida media
G1	m101H8	11.89
G1	m201F1	14.83
G2	m208F2	11.11
G2	m212A11	14.3
G2	m214F8	16.81
G2	m219D6	17.85
G2	m213B10	12.83
G3a	m102H8	12.16
G3a	m110G9	13.56
G3a	m415A8	12.92
G3b	m410G4	13.57
G3b	m414E1	13.01
G3b	m433H9	14.88
G4	m105G2	10.76
G5	m832E5	15.87

FIGURAS 12A-12B

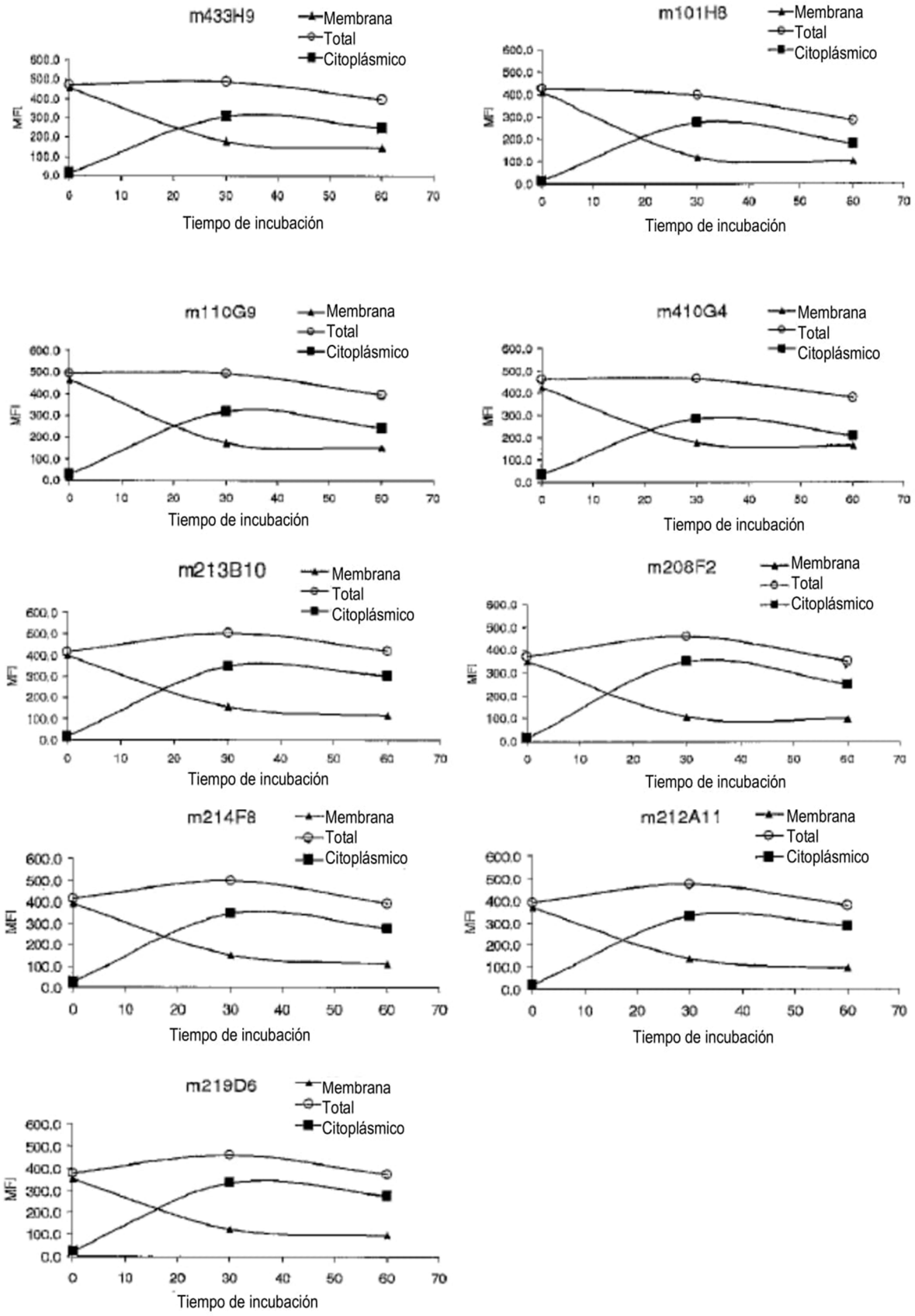


FIGURA 13 parte I

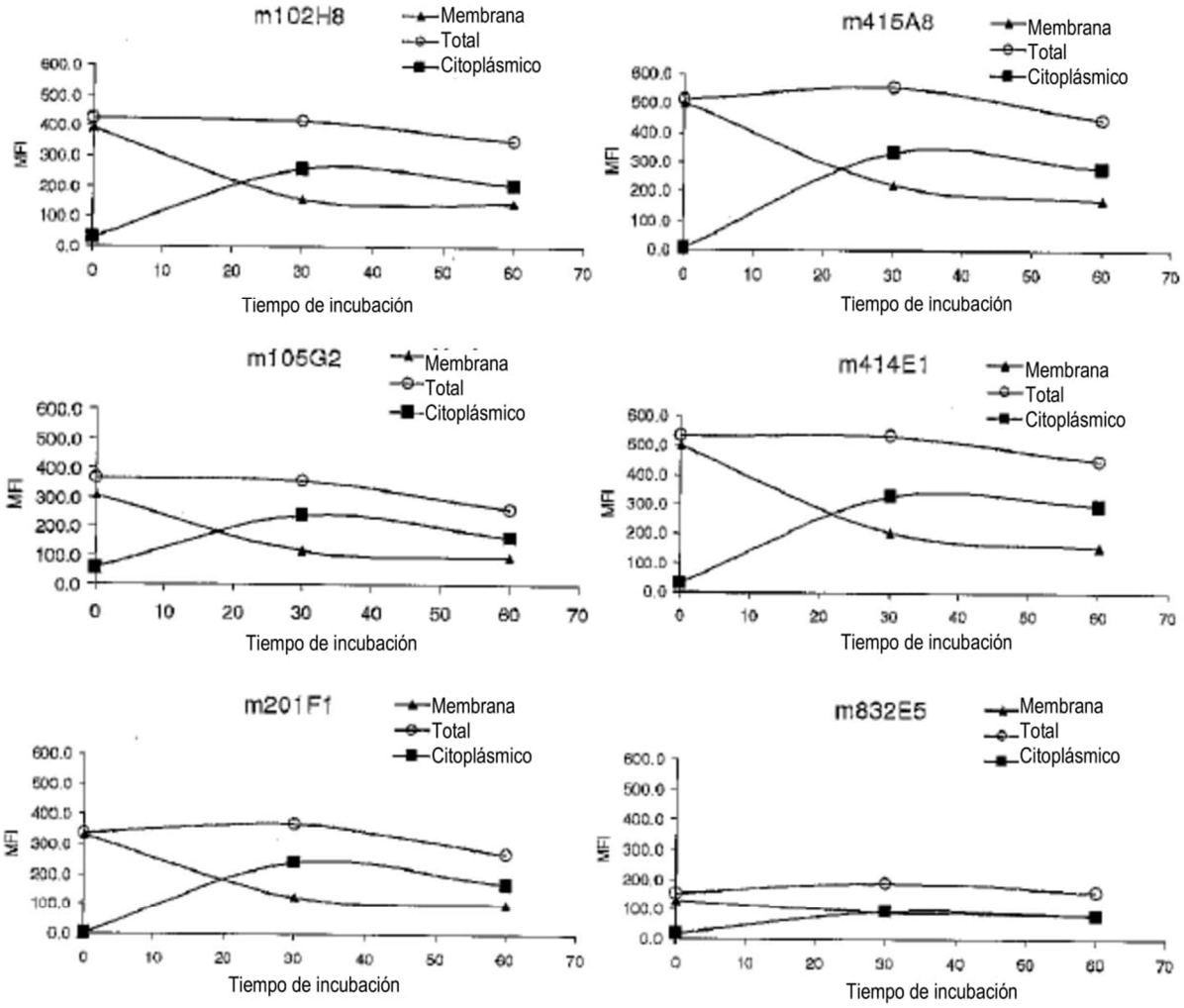


FIGURA 13 parte II

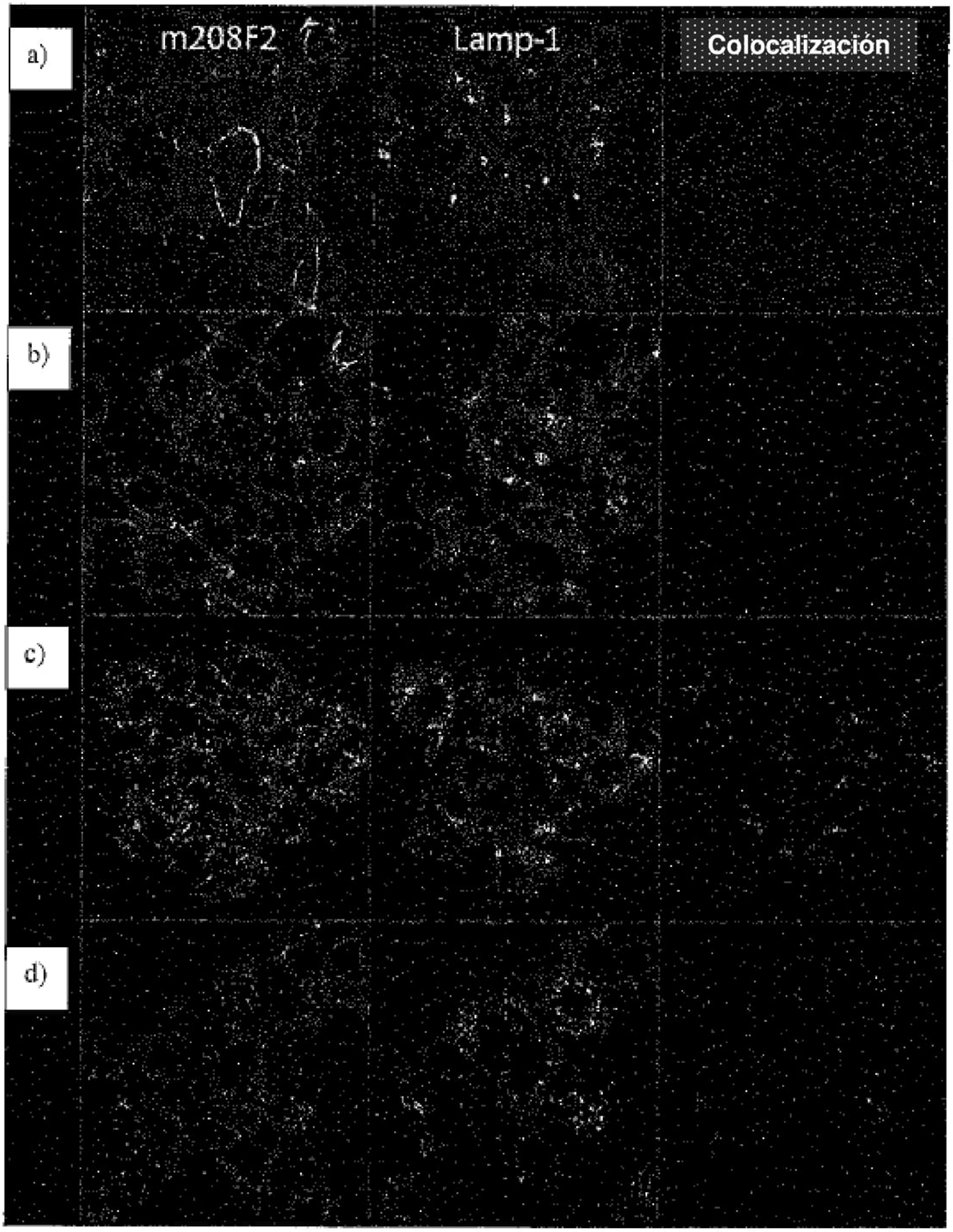


FIGURA 14A

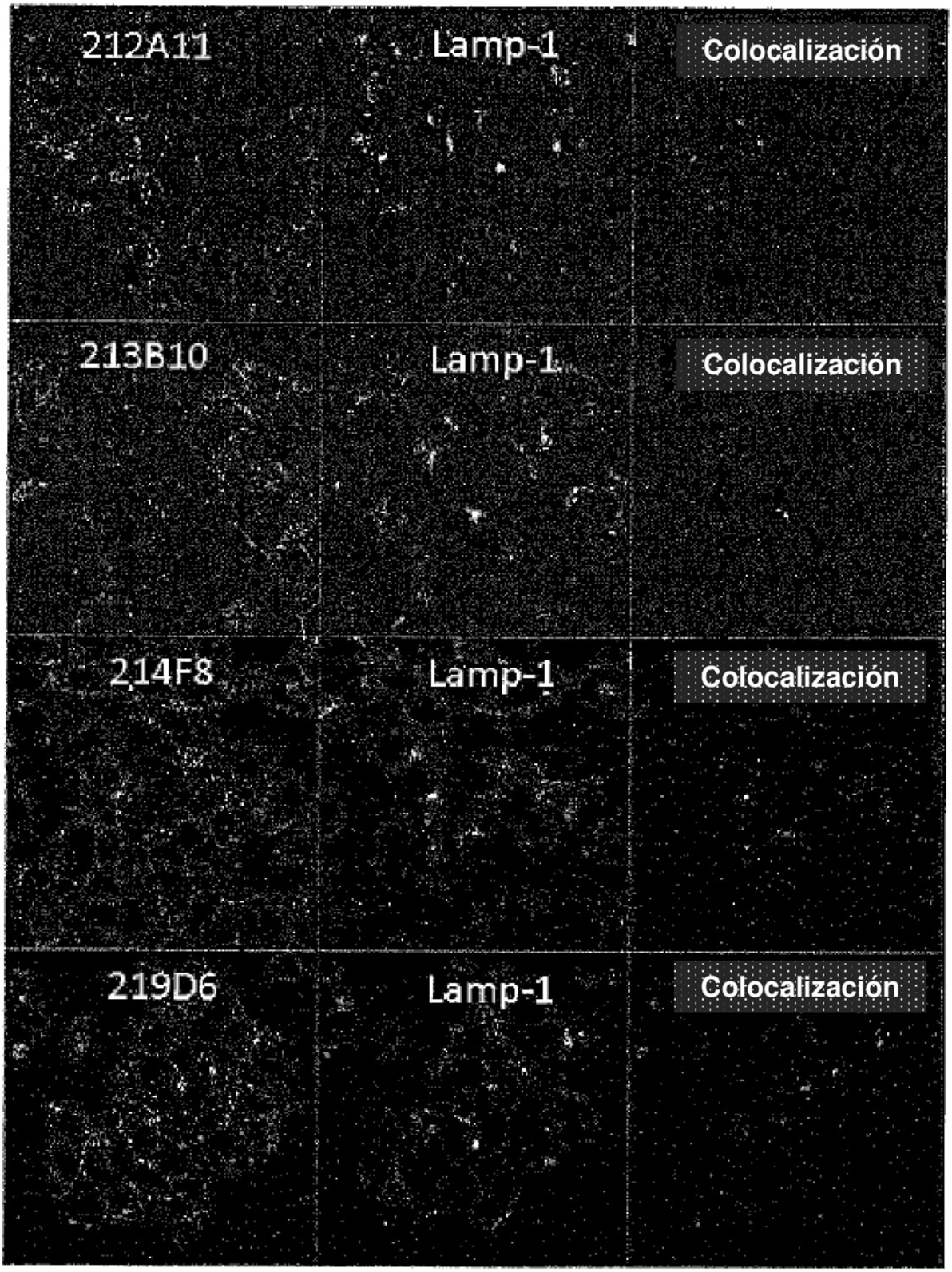


FIGURA 14B (parte I)

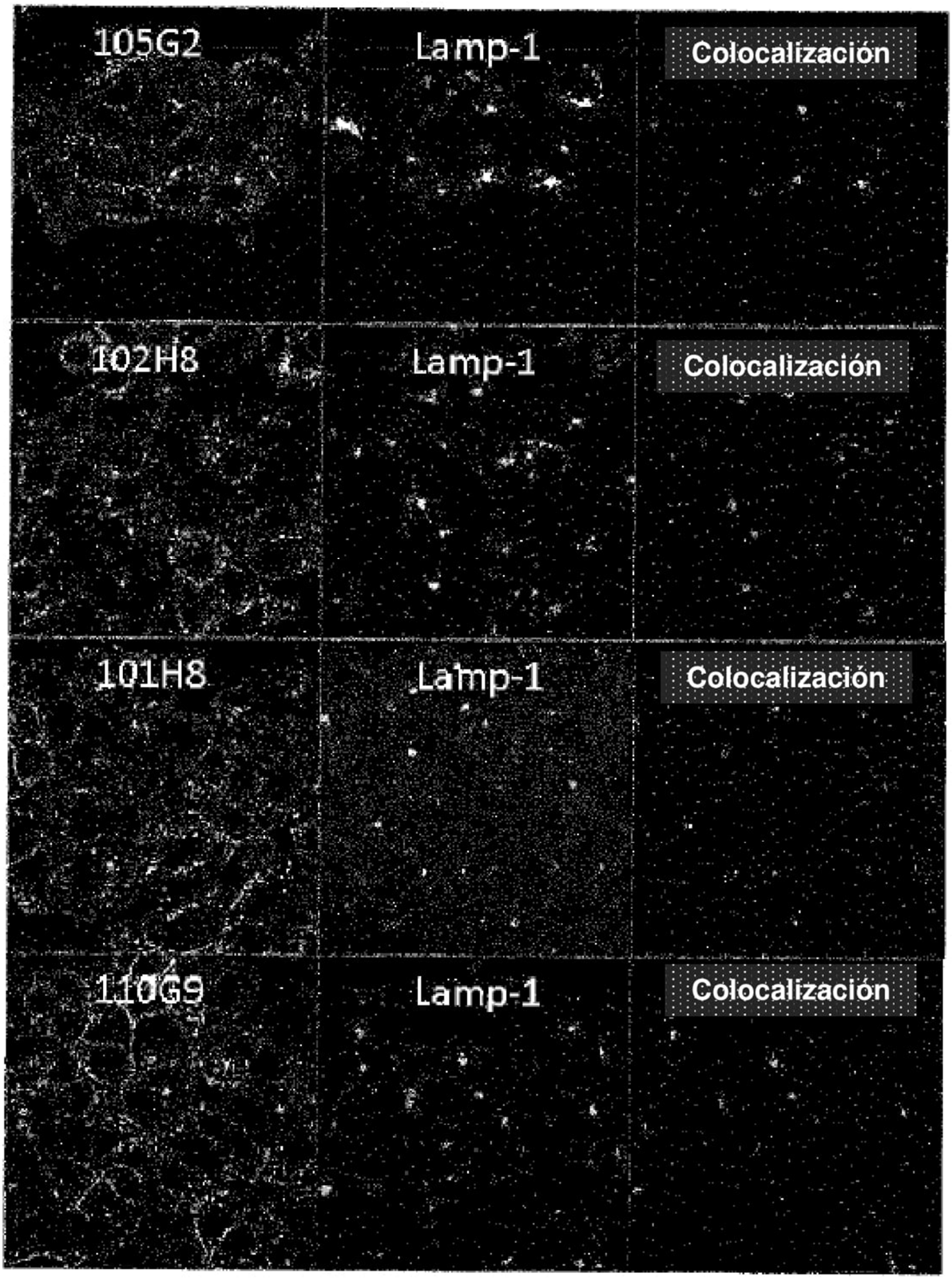


FIGURA 14B (parte II)

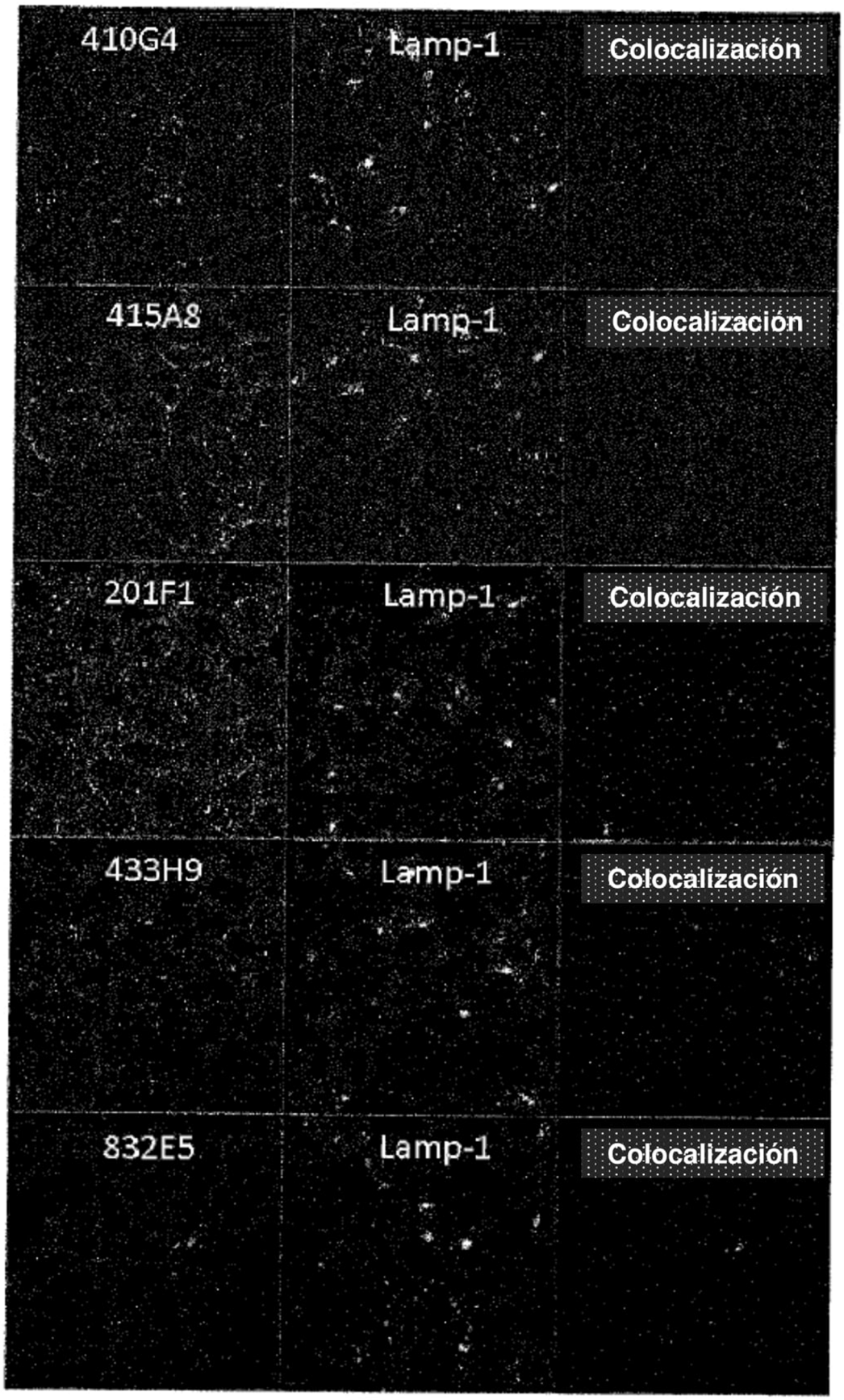


FIGURA 14B (parte III)

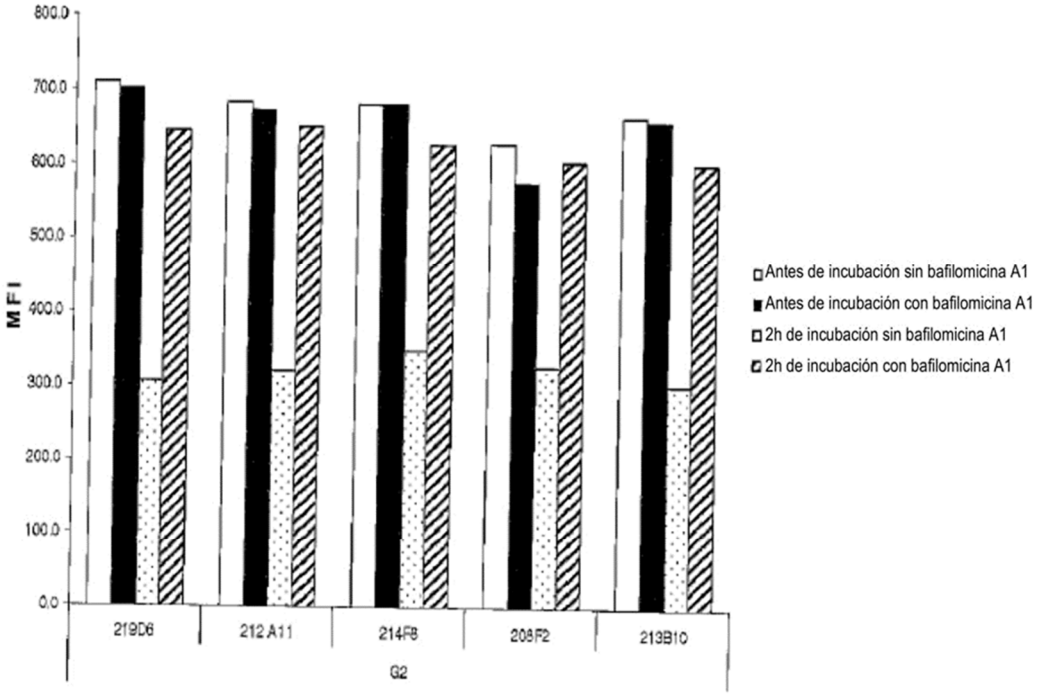

800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
MFI
219D6
212A11
214F8
208F2
213B10
G2
Antes de incubación sin bafilomicina A1
Antes de incubación con bafilomicina A1
2h de incubación sin bafilomicina A1
2h de incubación con bafilomicina A1

FIGURA 15

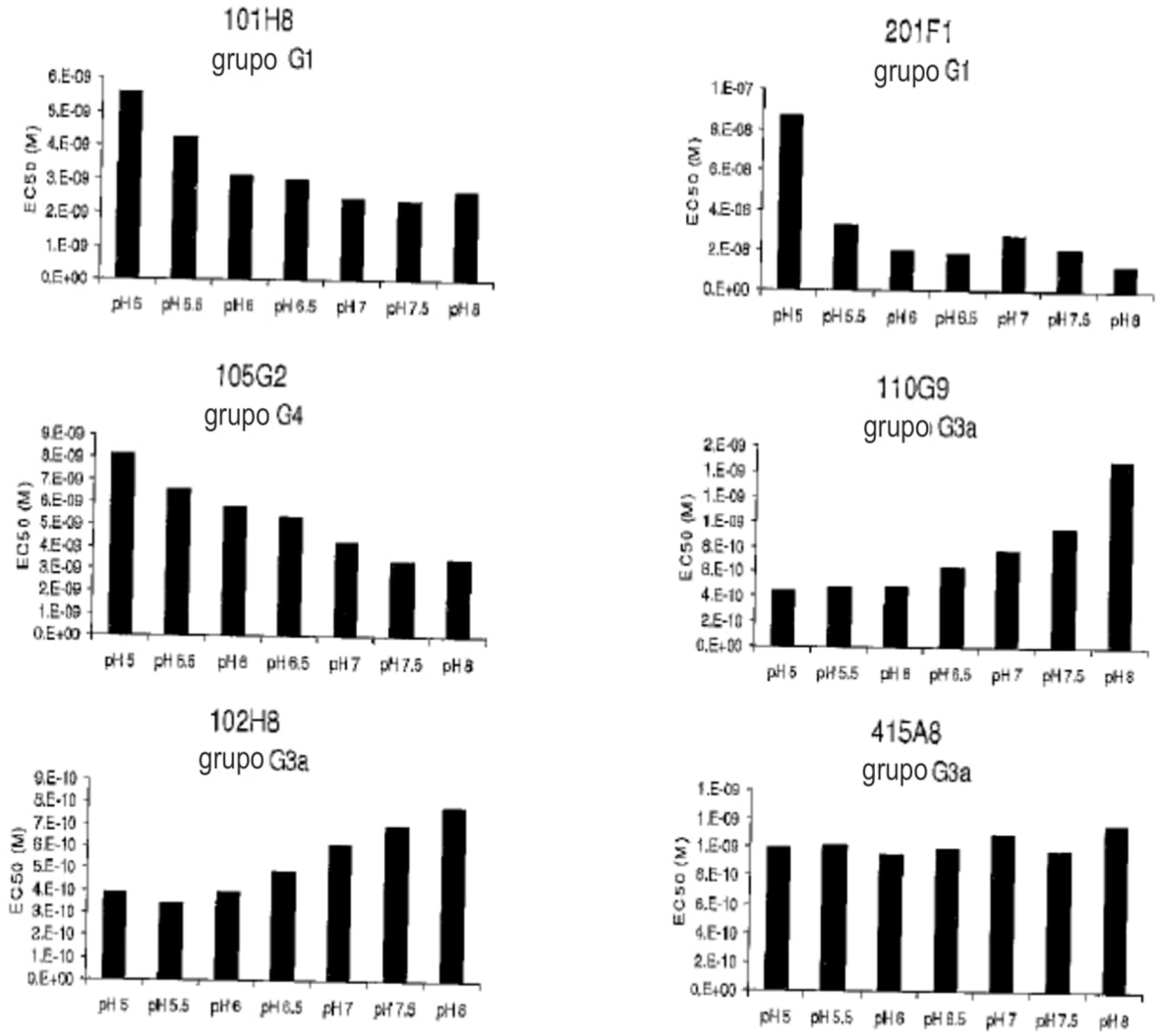


FIGURA 16 (parte I)

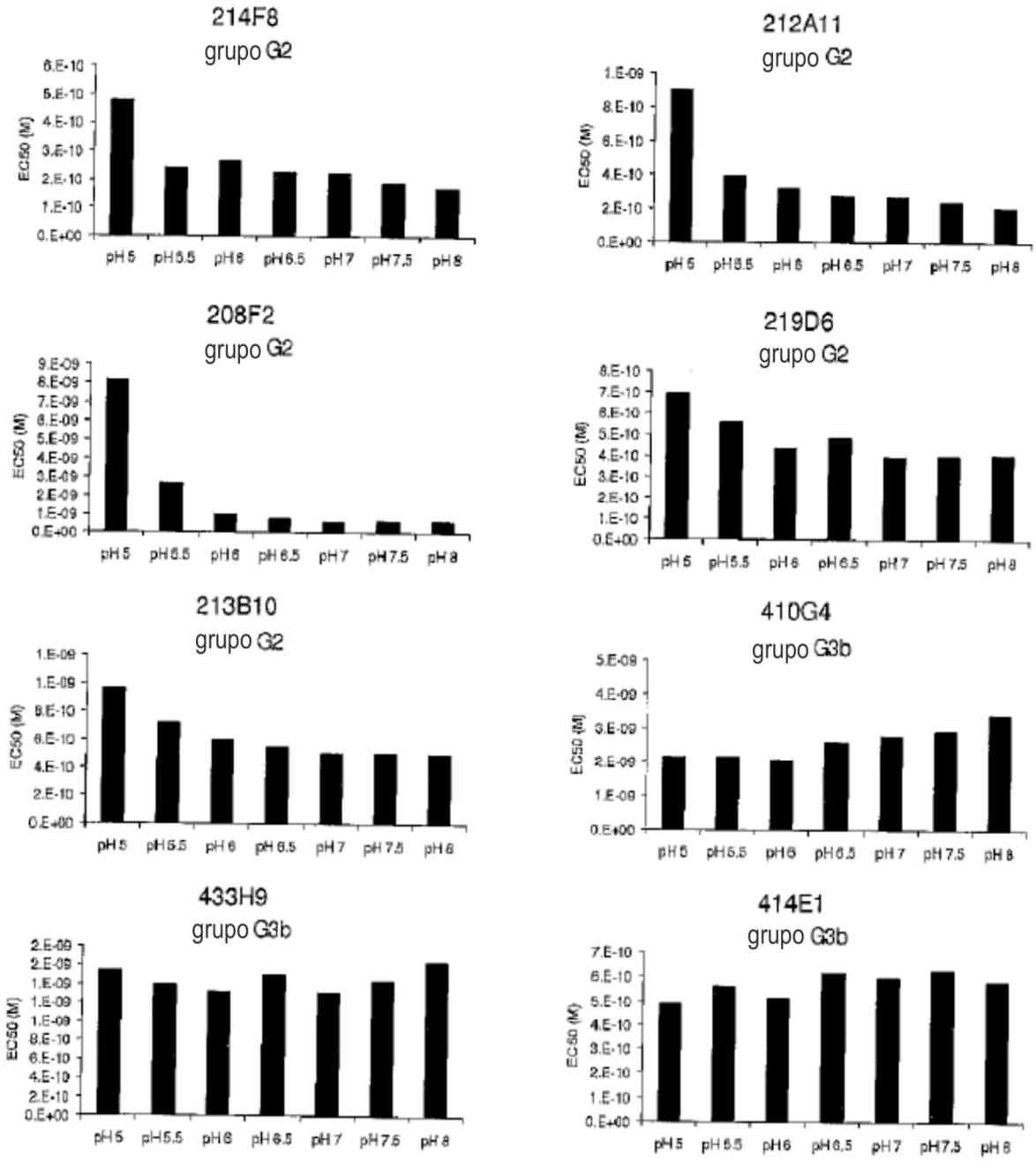


FIGURA 16 (parte II)

FIGURA 17A

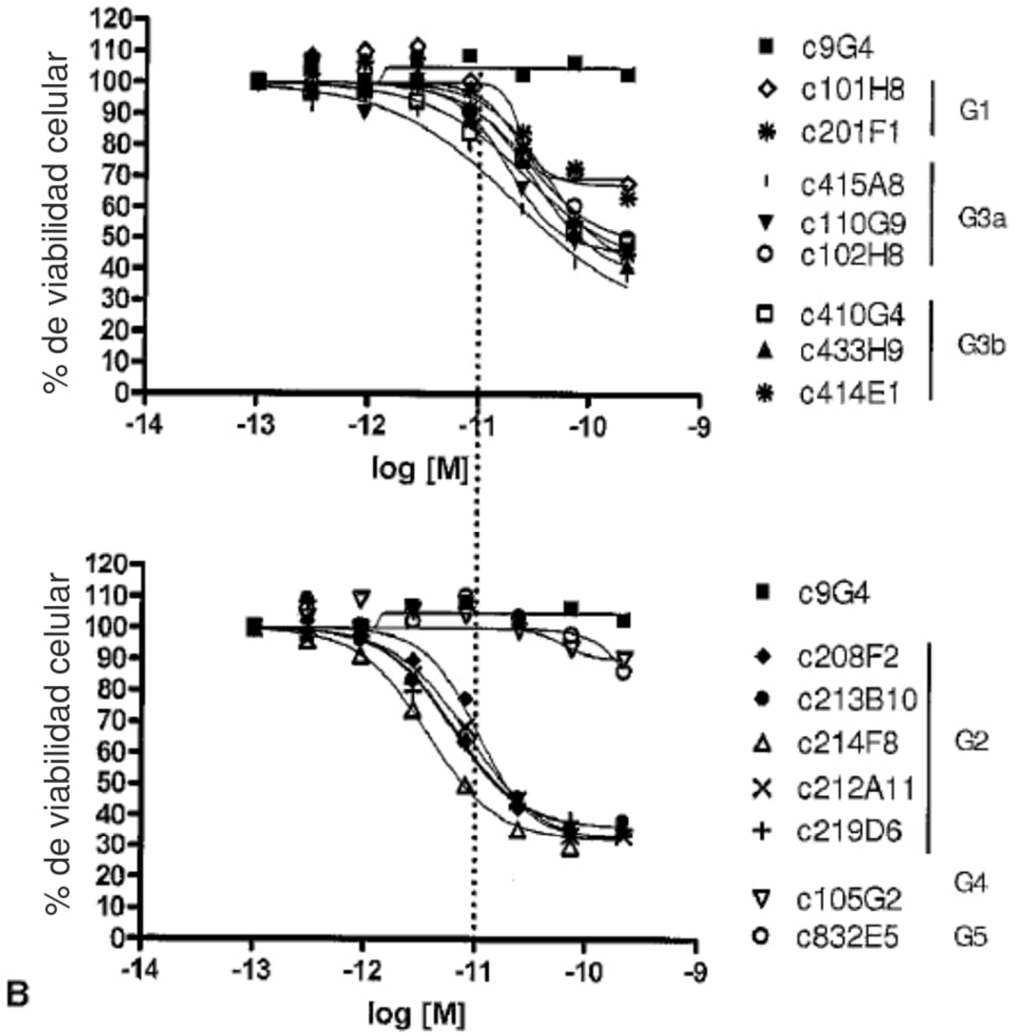
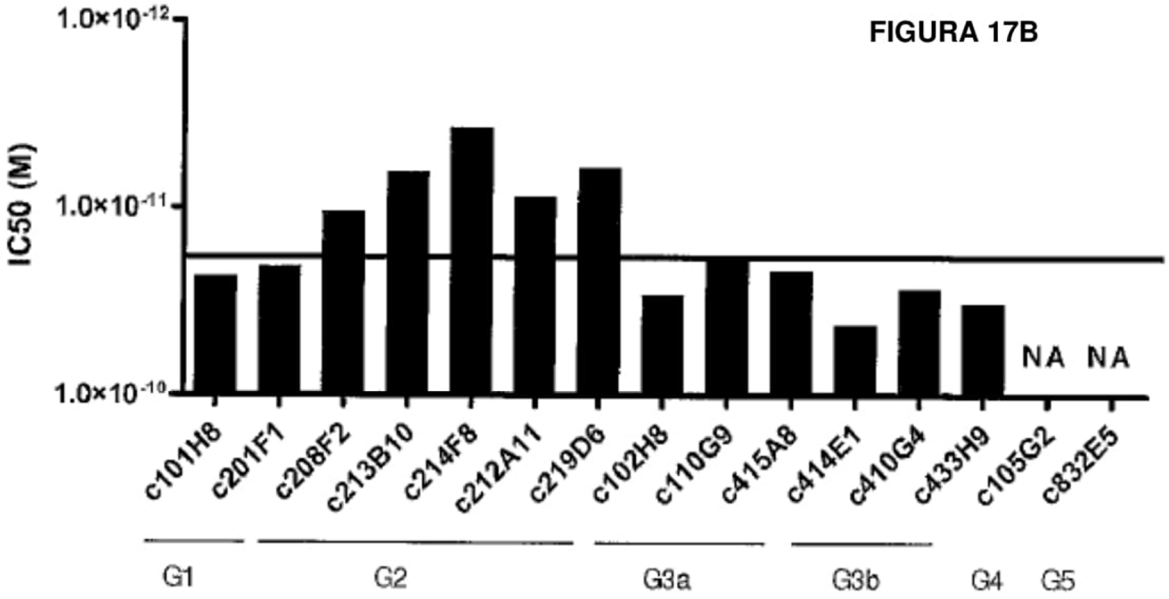


FIGURA 17B



FIGURAS 17A-17B

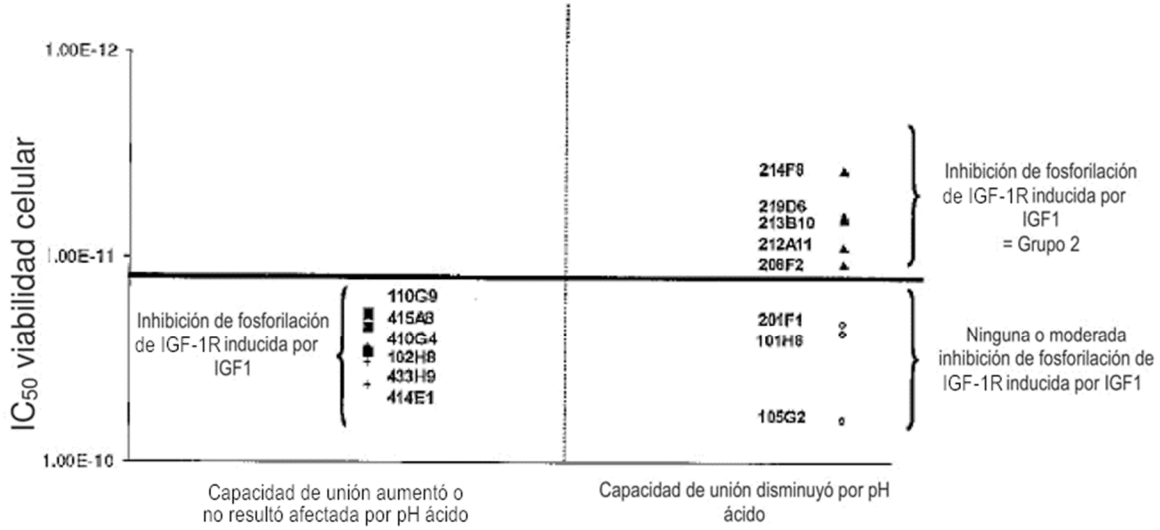

1.00E-12
1.00E-11
1.00E-10
IC50 viabilidad celular
214F8
219D6
213B10
212A11
206F2
Inhibición de fosforilación de IGF-1R inducida por IGF1 = Grupo 2
Inhibición de fosforilación de IGF-1R inducida por IGF1
110G9
415A8
410G4
102H8
433H9
414E1
201F1
101H6
105G2
Ninguna o moderada inhibición de fosforilación de IGF-1R inducida por IGF1
Capacidad de unión aumentó o no resultó afectada por pH ácido
Capacidad de unión disminuyó por pH ácido

FIGURA 18

FIGURA 19A

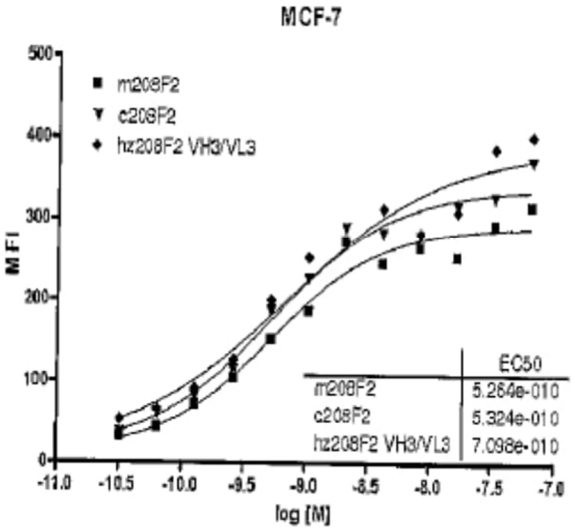
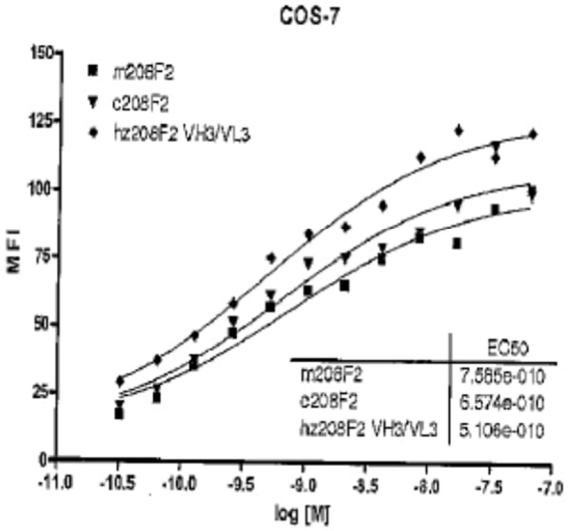


FIGURA 19B



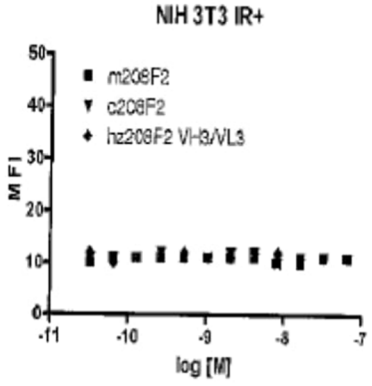


FIGURA 19C

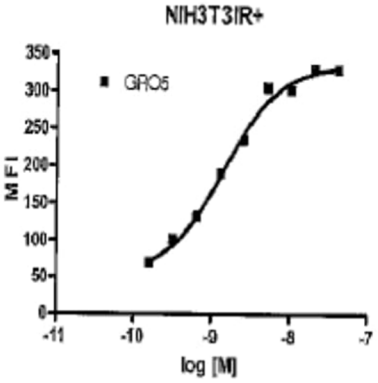


FIGURA 19D

FIGURAS 19A-19D

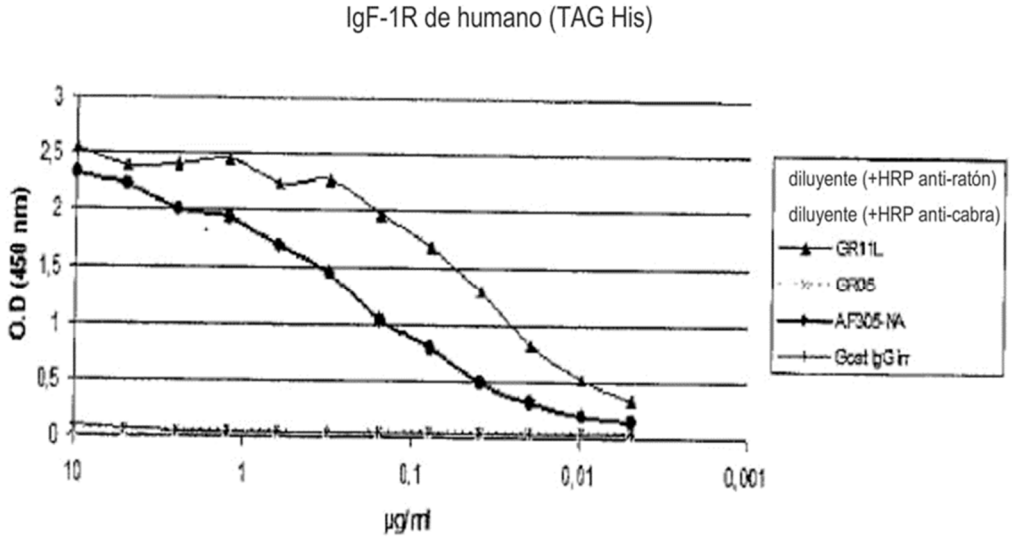


FIGURA 20A

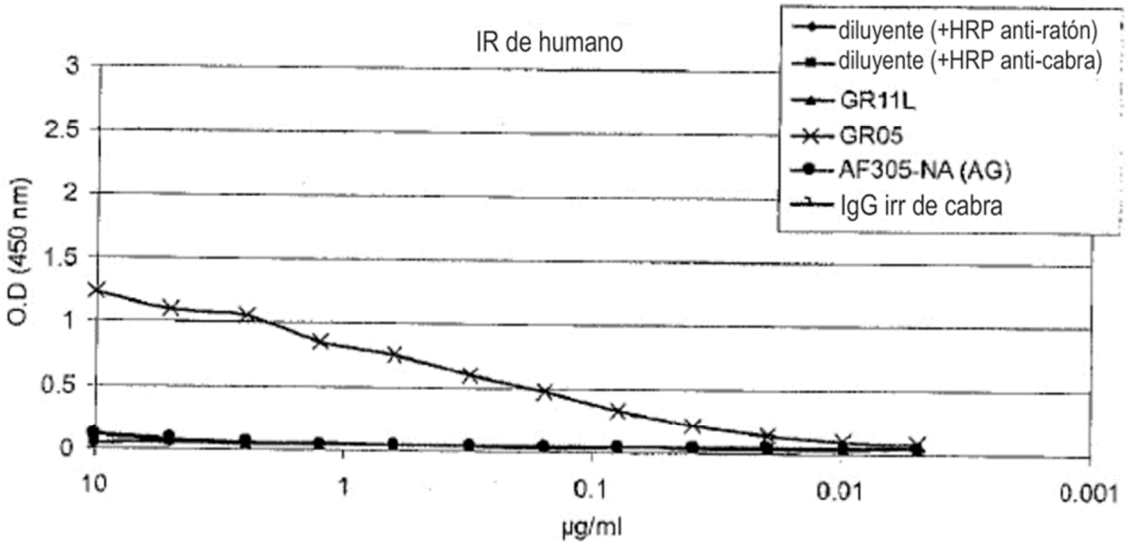


FIGURA 20B

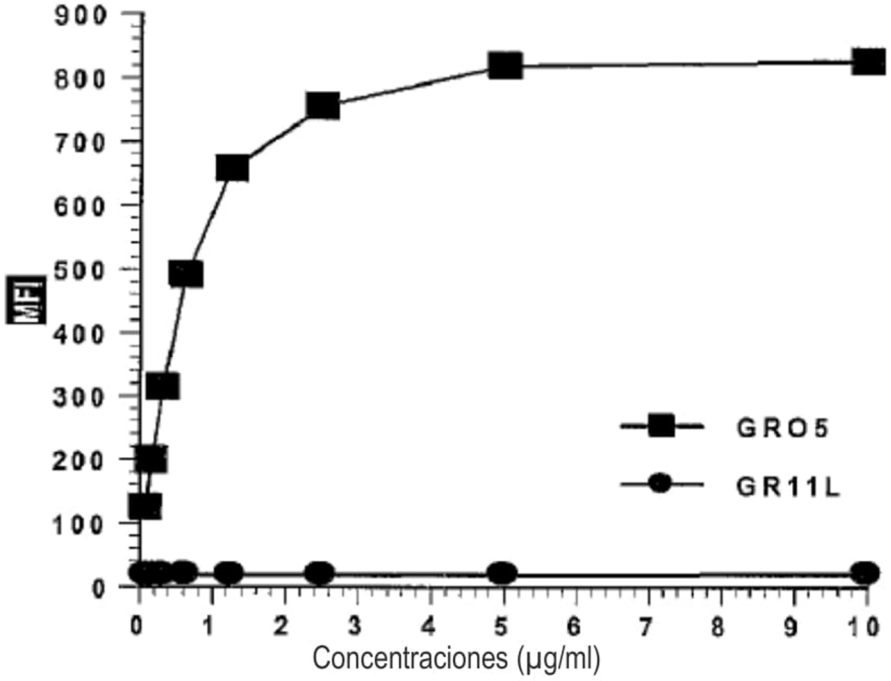


FIGURA 20C

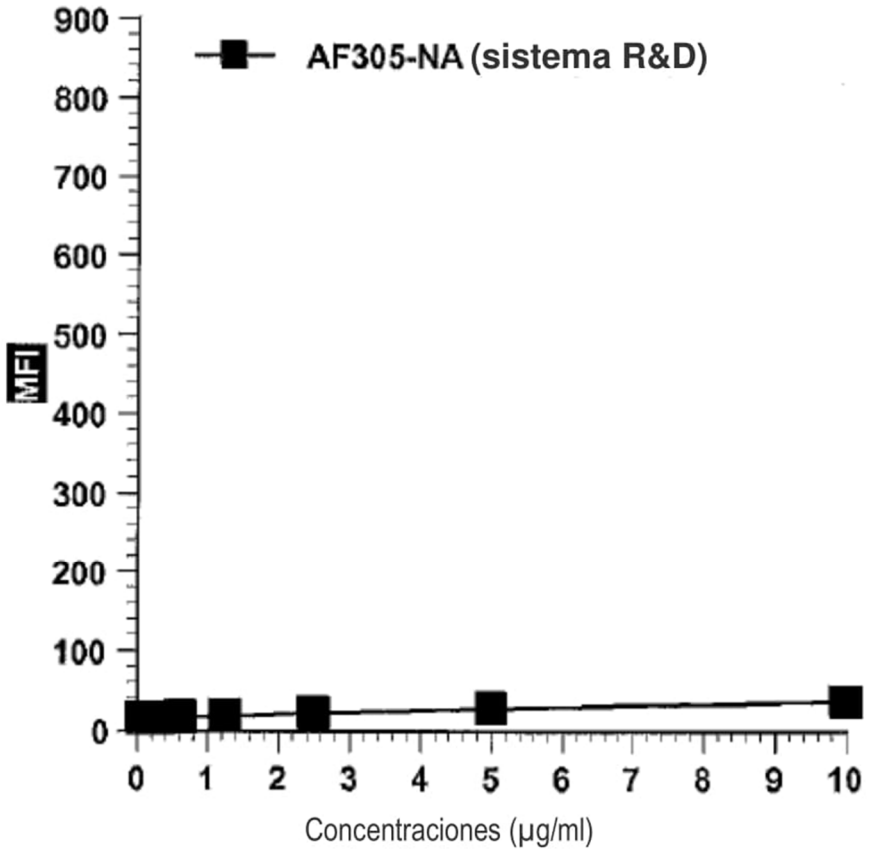


FIGURA 20D

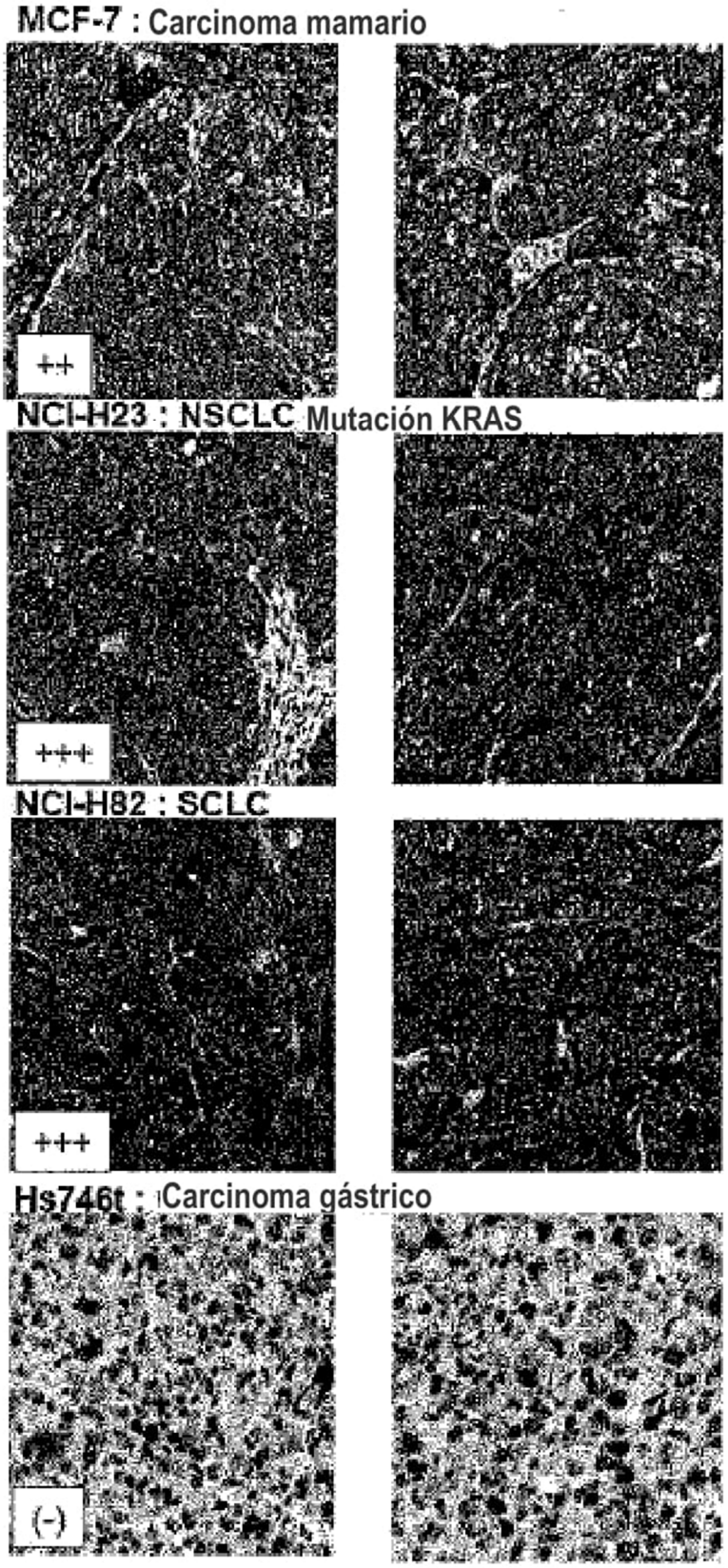

MCF-7 : Carcinoma mamario
++
NCI-H23 : NSCLC Mutación KRAS
+++
NCI-H82 : SCLC
+++
Hs746t : Carcinoma gástrico
(-)

FIGURA 21

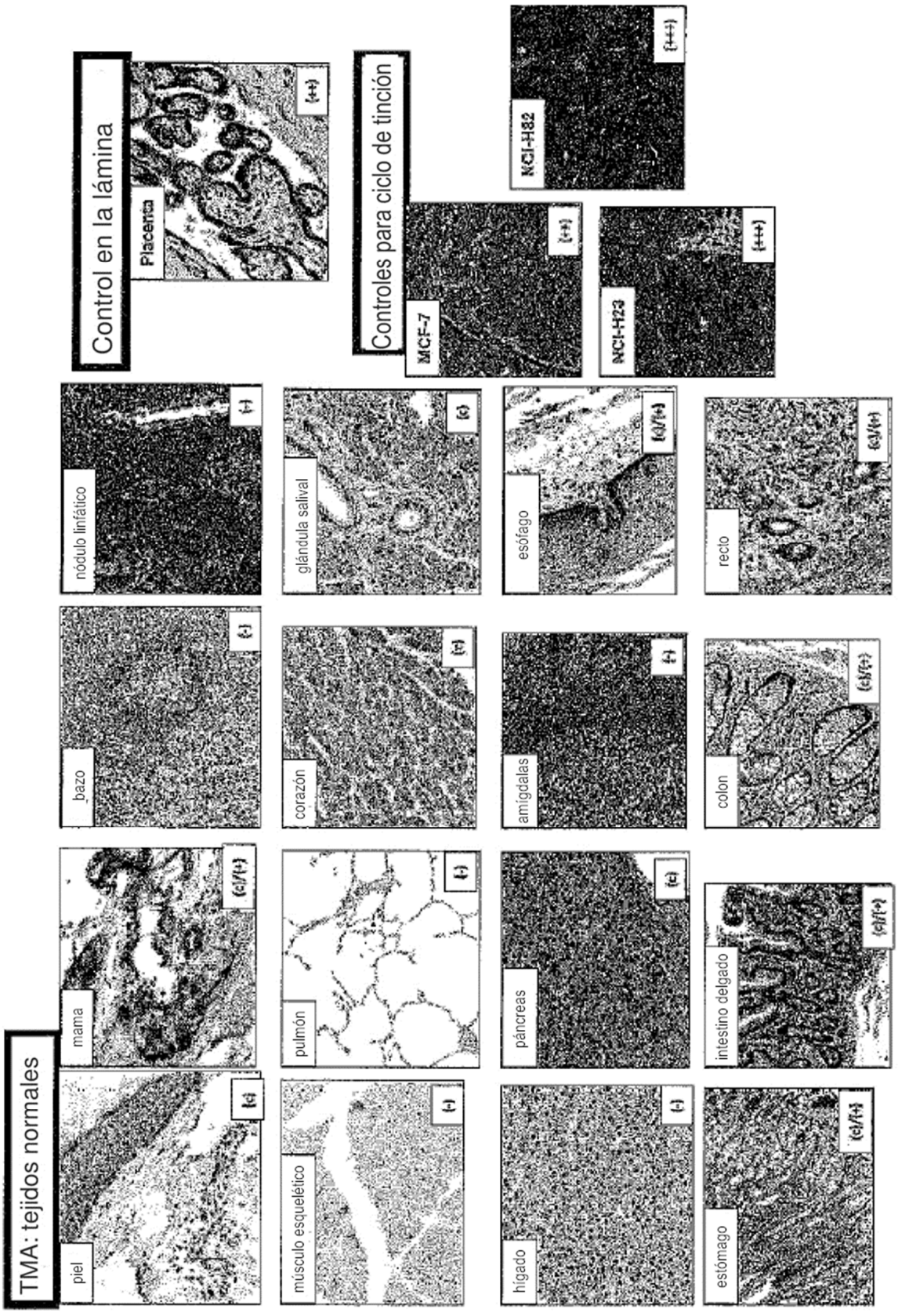

TMA: tejidos normales
piel
(-)
mama
(c)/(+)
bazo
(-)
nódulo linfático
(-)
Control en la lámina
Placenta
(++)
Controles para ciclo de tinción
MCF-7
(++)
NCI-H82
(+++)
NCI-H23
(+++)
músculo esquelético
(-)
pulmón
(-)
corazón
(+)
glándula salival
(c)
esófago
(c)/(+)
recto
(c)/(+)
hígado
(-)
páncreas
(c)
amígdalas
(+)
colon
(c)/(+)
estómago
(c)/(+)
intestino delgado
(c)/(+)

FIGURA 22A

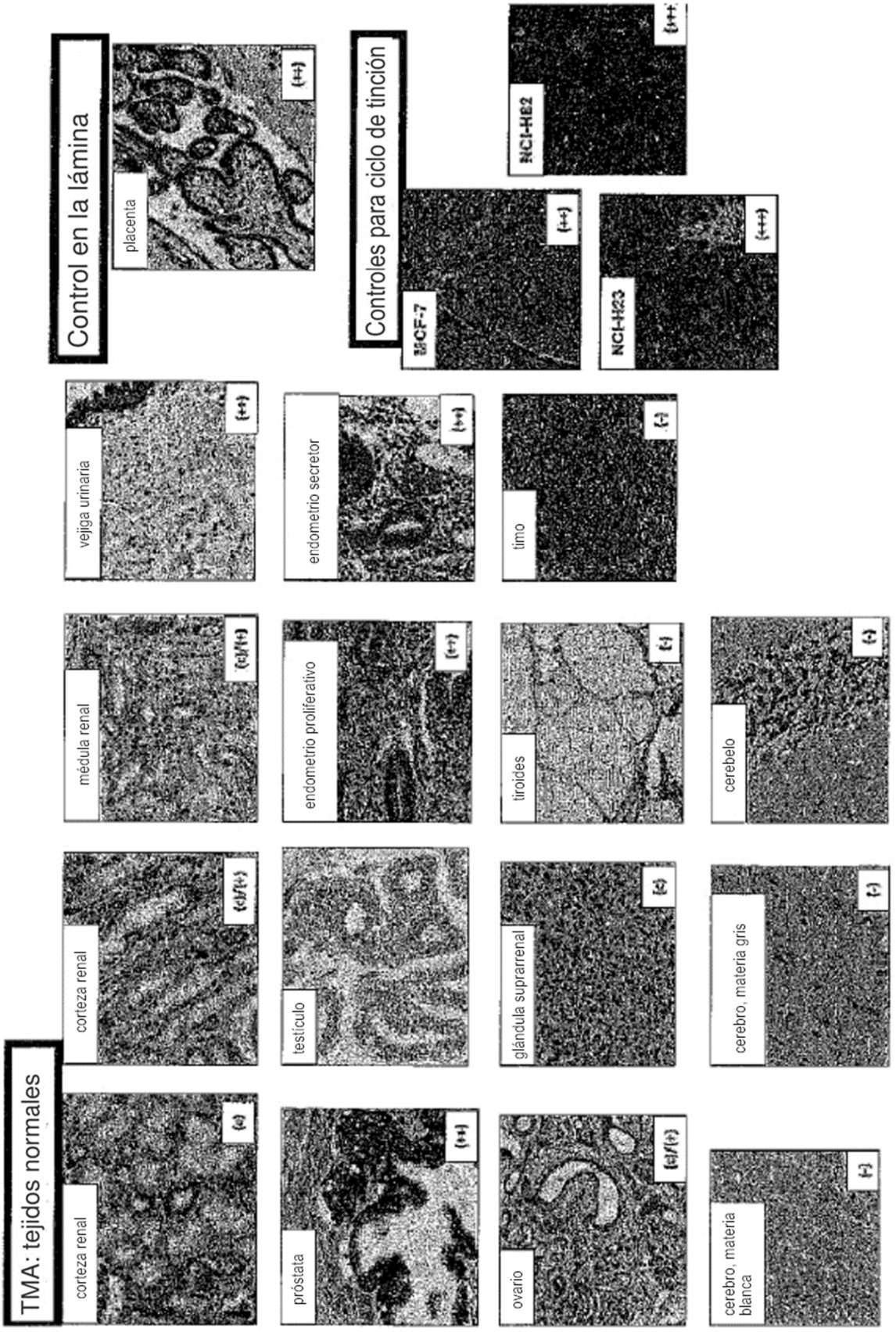

TMA: tejidos normales
corteza renal
(-)
corteza renal
(+)/(++)
médula renal
(+)/(++)
vejiga urinaria
(++)
próstata
(++)
testículo
(++)
endometrio proliferativo
(++)
endometrio secretor
(++)
ovario
(+)/(++)
glándula suprarrenal
(-)
tiroides
(-)
timo
(-)
cerebro, materia blanca
(-)
cerebro, materia gris
(-)
cerebelo
(-)
Control en la lámina
placenta
(++)
Controles para ciclo de tinción
MCF-7
(++)
NCI-H23
(+++)
NCI-H82
(+++)

FIGURA 22B

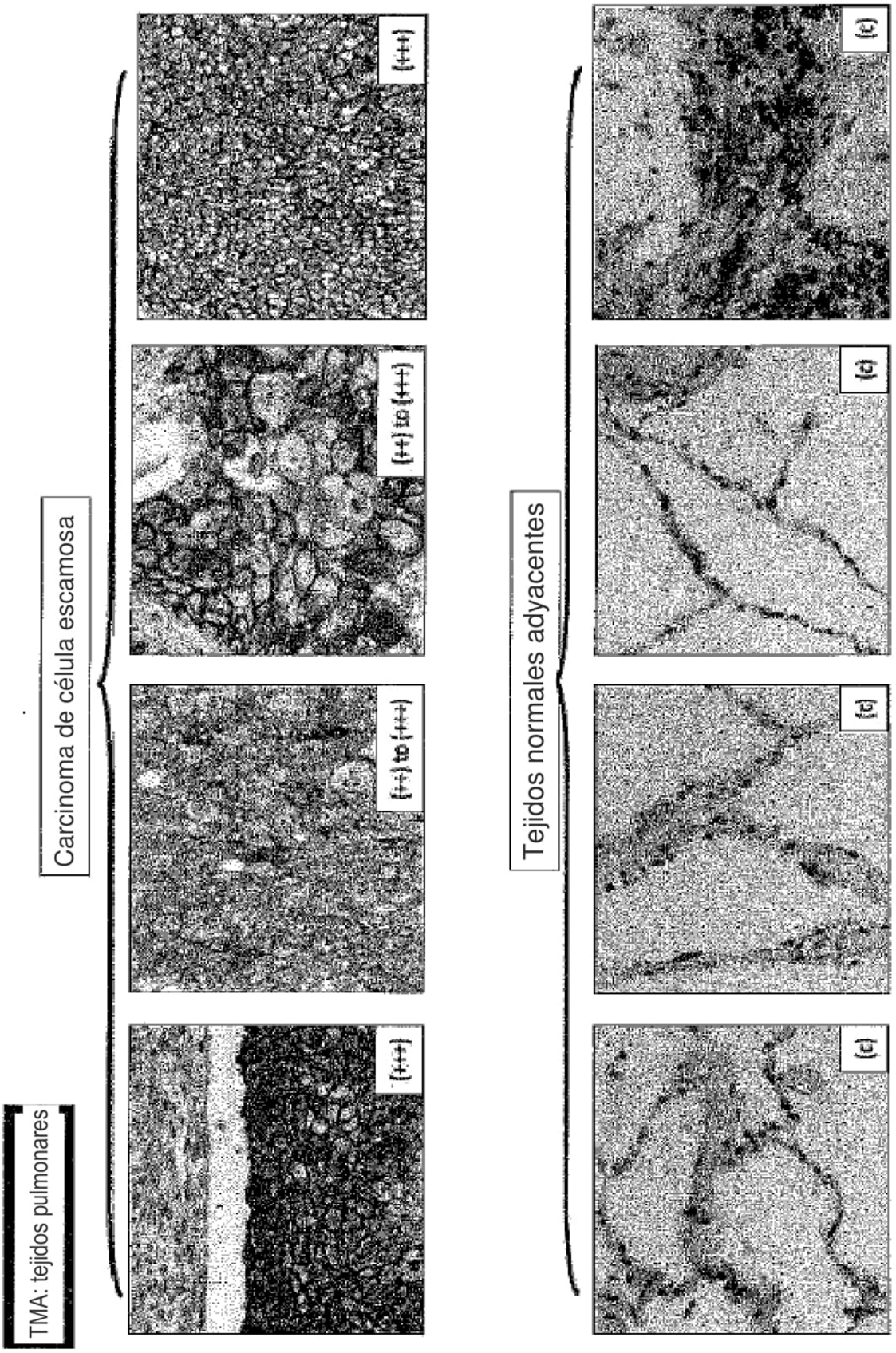

TMA: tejidos pulmonares
Carcinoma de célula escamosa
(+++)
(++) to (+++)
(++) to (+++)
(+++)
Tejidos normales adyacentes
(-)
(-)
(-)
(-)

FIGURA 23

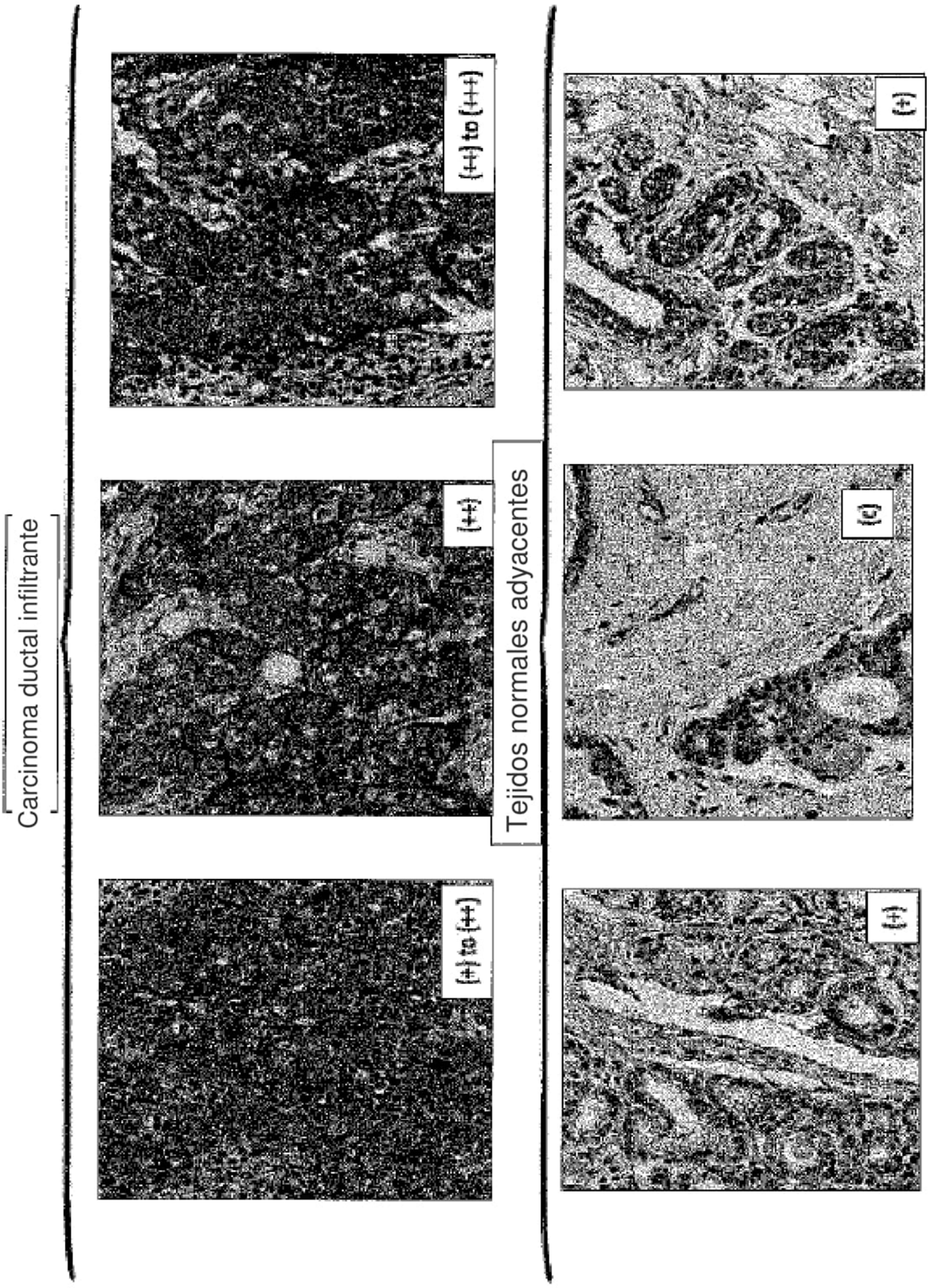

Carcinoma ductal infiltrante
Tejidos normales adyacentes
(++) to (+++)
(++)
(+) to (++)
(+)
(-)
(+)

FIGURA 24

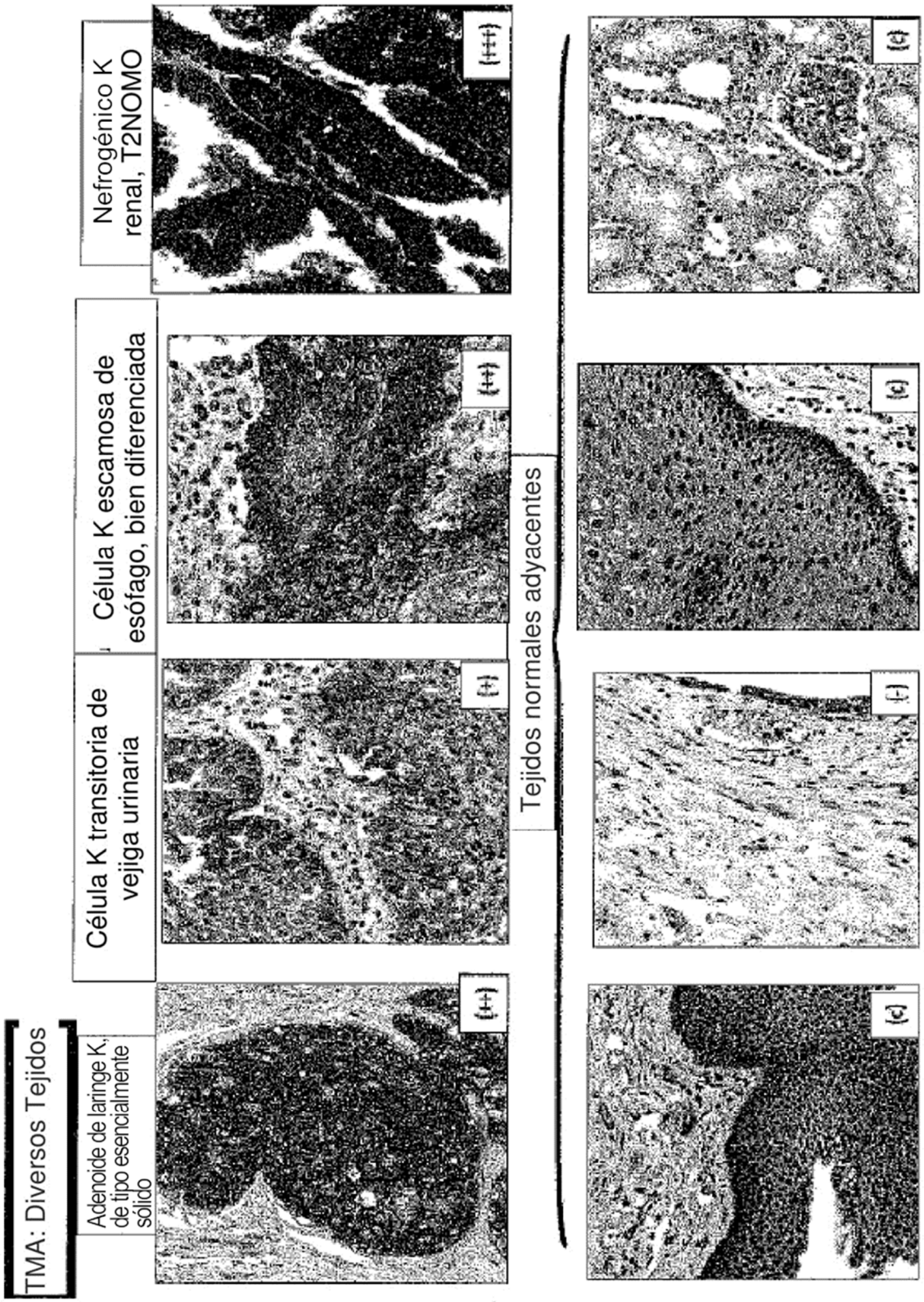

TMA: Diversos Tejidos
Adenoide de laringe K, de tipo esencialmente sólido
(+++)
Célula K transitoria de vejiga urinaria
(+)
Célula K escamosa de esófago, bien diferenciada
(++)
Nefrogénico K renal, T2NOMO
(+++)
Tejidos normales adyacentes
(-)
(-)
(-)

FIGURA 25

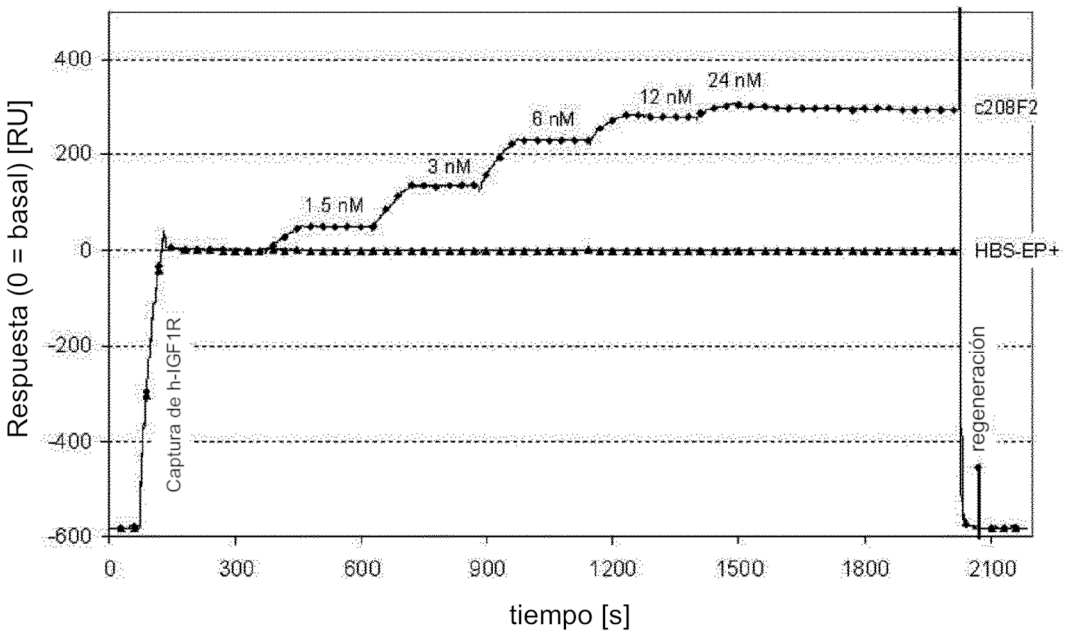


FIGURA 26

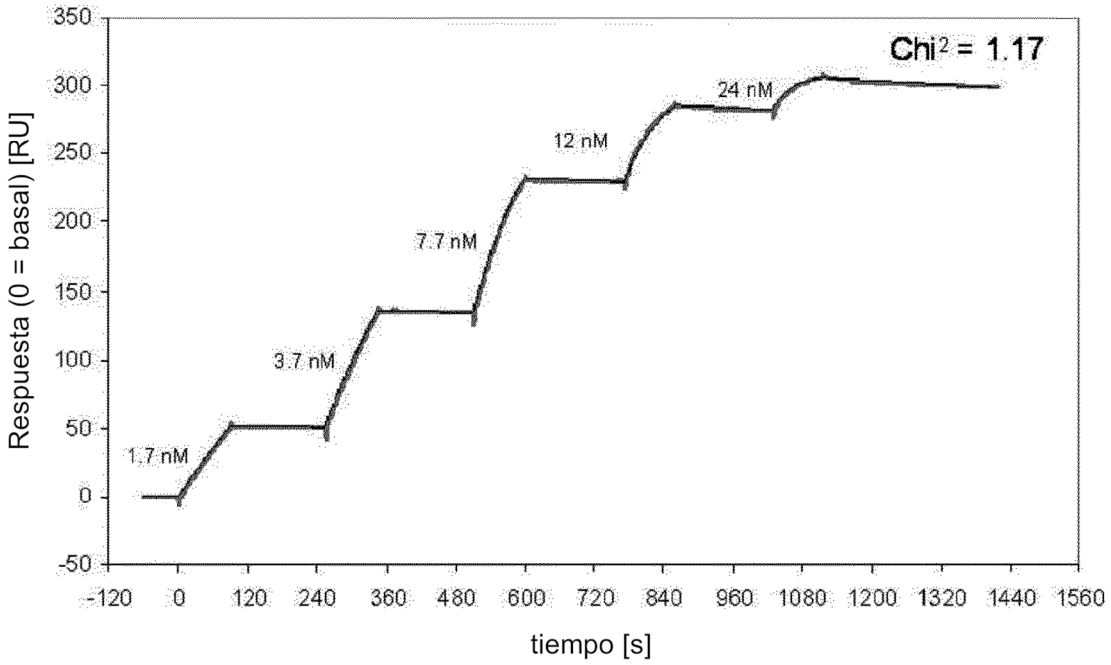


FIGURA 27

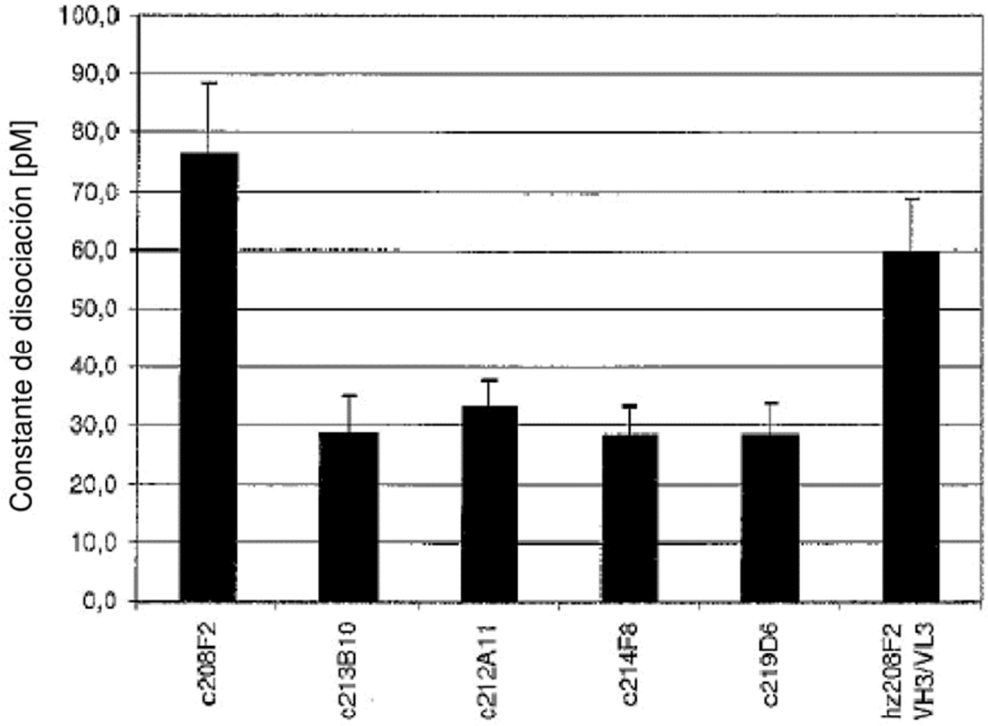


FIGURA 28

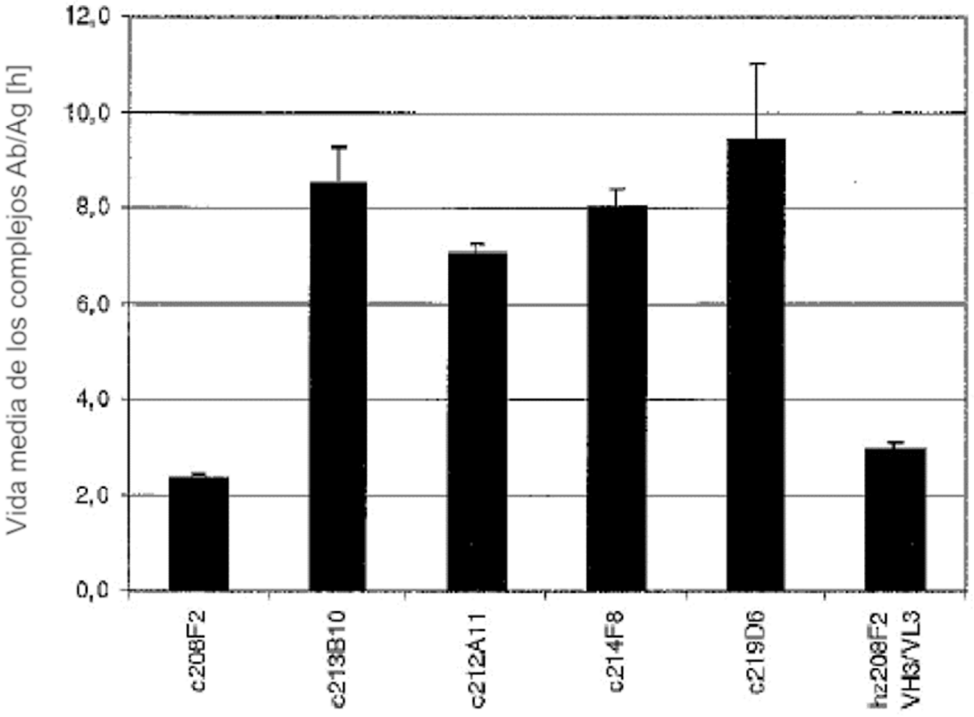


FIGURA 29

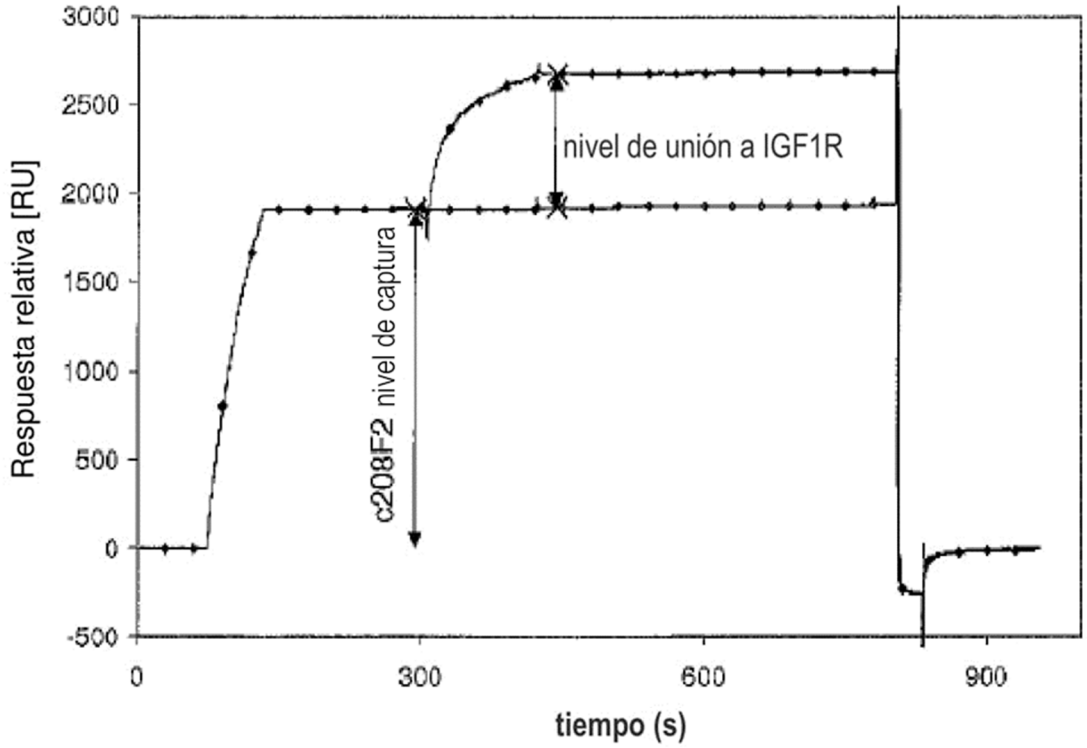


FIGURA 30

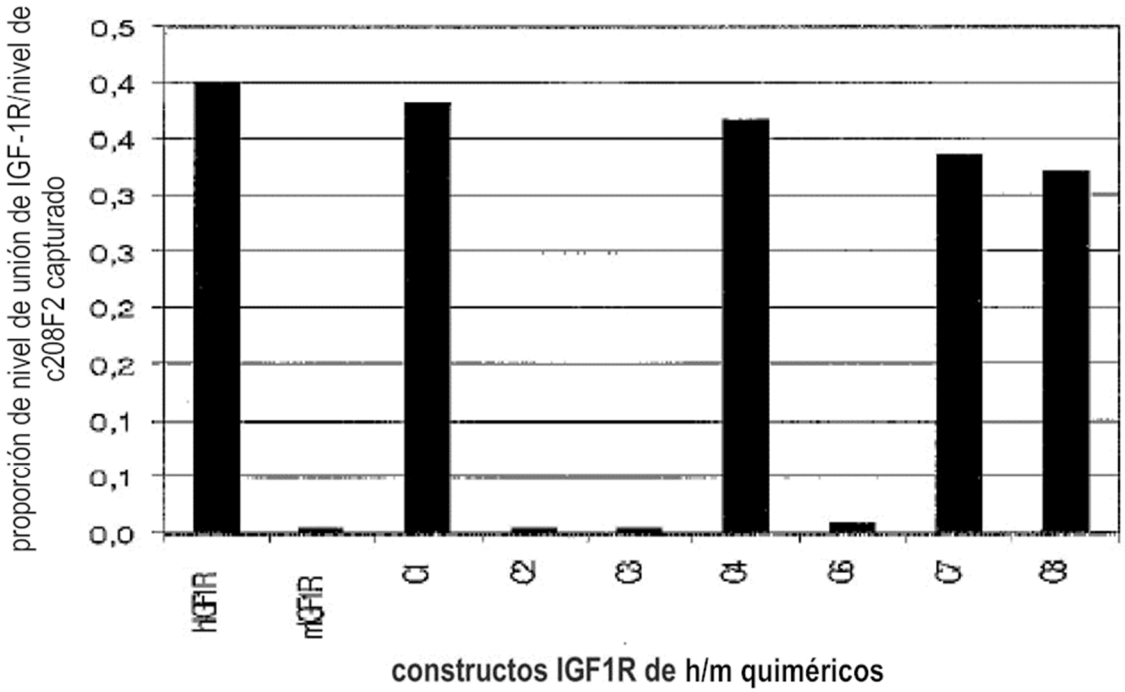


FIGURA 31

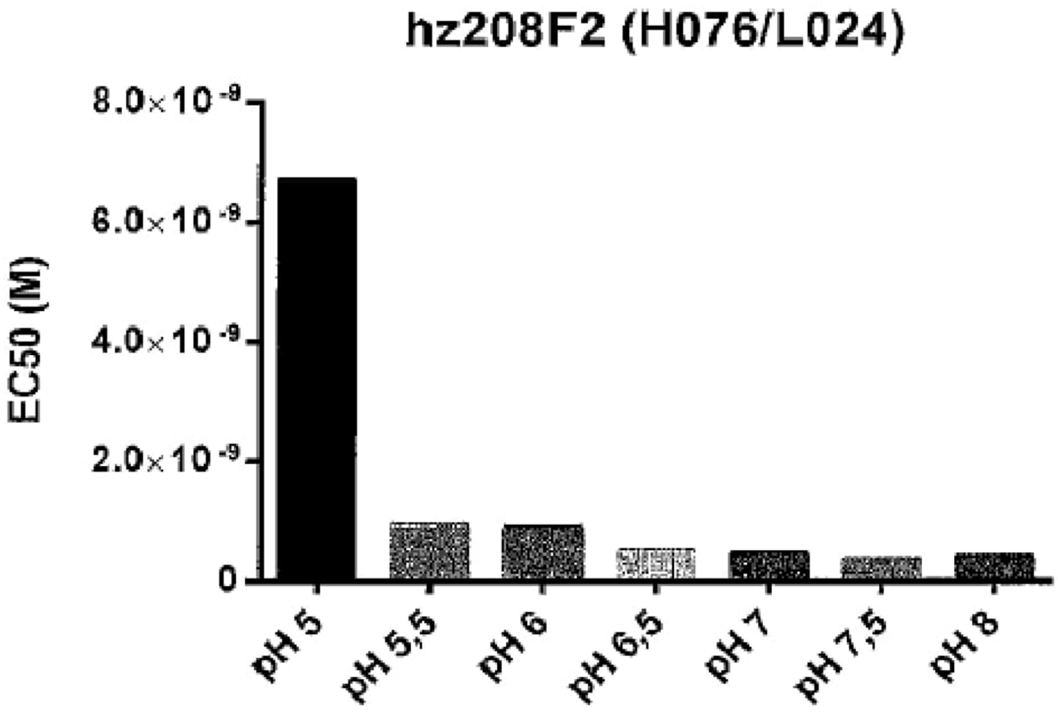


FIGURA 32A

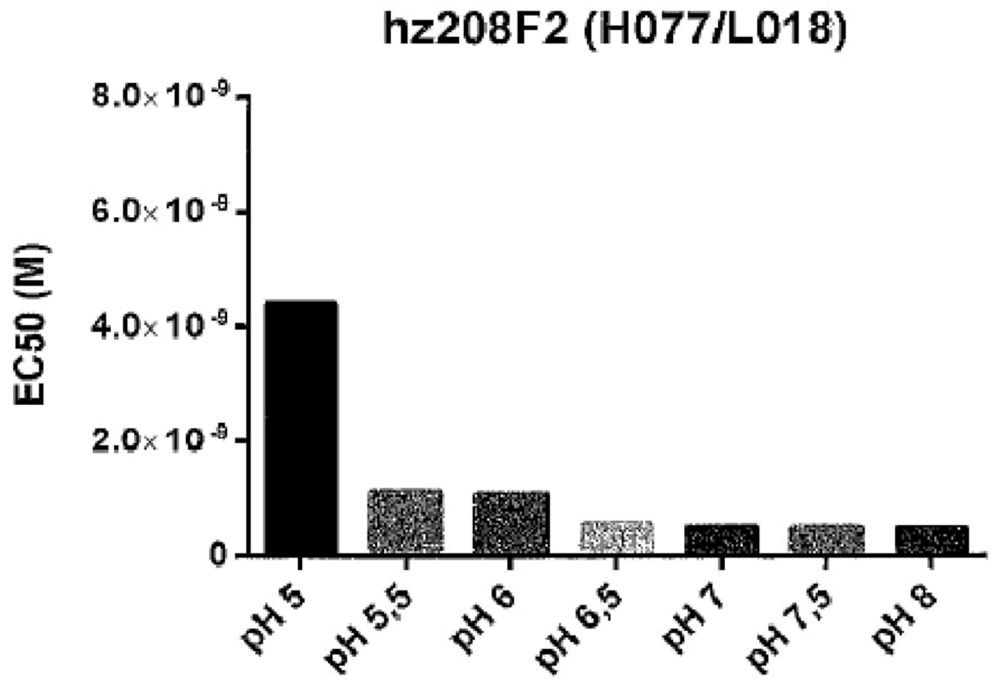


FIGURA 32B

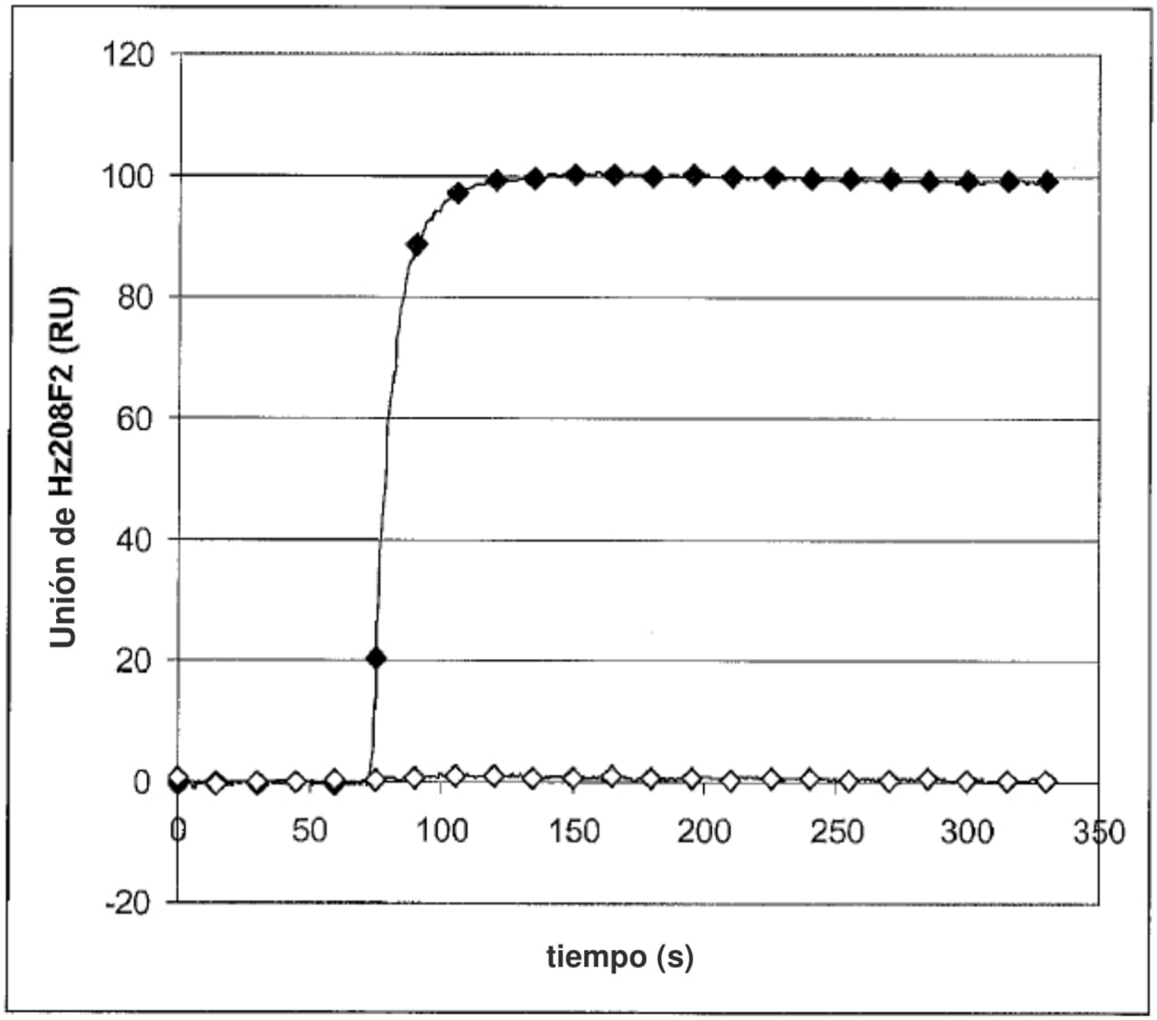

120
100
80
60
40
20
0
-20
0
50
100
150
200
250
300
350
Unión de Hz208F2 (RU)
tiempo (s)

FIGURA 33