

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0622074-6 A2**

(62) Data de Depósito do Pedido Original:

PI0622074 - 19/06/2006

(22) Data de Depósito: 19/06/2006

(43) Data da Publicação: 26/10/2010

(RPI 2077)



(51) *Int.Cl.:*

C07K 16/22

Notificação de Depósito de Pedido Dividido:

RPI 2077 de 26/10/2010

(54) Título: **ANTICORPOS DE PDGFR α**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 US 60/691.920

(73) Titular(es): Drexel University College of Medicine, Imclone Systems Incorporated, University Of Washington

(72) Inventor(es): Alessandro Fatatis, Dale L. Ludwig, Jim Huber, Nick Loizos, Stephen R. Plymate

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel -Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2006023856 de 19/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/138729 de 28/12/2006

(57) Resumo: ANTICORPOS DE PDGFR α . A invenção fornece usos de um antagonista IGF-IR e/ou PDGFR α na fabricação de medicamentos para tratar câncer ósseo, em particular o câncer ósseo metastático. A invenção fornece também anticorpos que se ligam aos PDGFR α humanos e neutralizam a ativação dos receptores. A invenção ainda fornece um método para neutralizar a ativação de PDGFR α , e um uso do anticorpo isoladamente ou em combinação com outros agentes na fabricação de medicamentos para tratar uma doença neoplásica.



PI0622074-6

"ANTICORPOS DE PDGFR α "

Dividido do PI0611984-0 depositado em 19/06/2006.

Campo da Invenção

A invenção fornece métodos de tratamento do câncer ósseo, em particular do câncer metastático ósseo, por administrar um antagonista IGF-IR e/ou um antagonista de PDGFR α . A invenção fornece também anticorpos que se ligam aos PDGFR α humanos e neutralizam a ativação dos receptores. A invenção ainda fornece um método para neutralizar a ativação de PDGFR α , e um método de tratamento de um mamífero com uma doença neoplásica utilizando os anticorpos isoladamente ou em combinação com outros agentes.

Histórico da Invenção

O câncer de próstata é mais comum entre os homens, com cerca de 220.000 casos e 29.000 mortes por ano nos Estados Unidos. Uma proporção significativa dos homens diagnosticados com câncer de próstata têm doença metastática. Além disso, eventualmente, a metástase se desenvolve em muitos outros pacientes de câncer de próstata, apesar do tratamento com cirurgia ou radioterapia. O osso é o local mais comum da metástase do câncer da próstata, e é também um local para onde o câncer pulmonar e câncer de mama frequentemente metastatizam. A maioria das metástases de próstata são androgênio-dependentes, de modo a que haja uma resposta rápida à castração cirúrgica ou médica, mas em quase todos os pacientes, a tumoral eventualmente torna-se androgênio-independente, levando a significativa morbidade e mortalidade. Uma vez que as metástases ósseas ocorrem, os tratamentos atualmente disponíveis têm um efeito limitado. A terapia mais eficaz aprovada que foi descrita para o câncer de próstata metastático (administração de docetaxel) prolonga a sobrevivência média em aproximadamente três meses. (Petrylak *et al.*, 2004, N. Engl. J. Med. 351:1513; Tannock *et al.*, 2004, N. Engl. J. Med. 351:1502) Assim, novas terapias para o câncer metastático ósseo são urgentemente necessárias.

O receptor do fator de crescimento similar à insulina (IGF-IR) é um receptor de tirosina quinase transmembrana onipresente que é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normal fetal e pós-natal. IGF-IR está localizado na superfície celular da maioria dos tipos de células e serve como molécula sinalizadora para os fatores de crescimento IGF-I e IGF-II (coletivamente denominado doravante IGFs). O IGF-IR pode estimular a proliferação celular, diferenciação celular, mudanças no tamanho das células, e proteger as células de apoptose. Ele também foi considerado como sendo quase obrigatório para transformação de células (revisto em Adams *et al.*, Cell. Mol. Life Sc. 57:1050-93 (2000); Baserga, Oncogene 19:5574-81 (2000)). Altos níveis de expressão de IGF-IR foram relatados em amostras de tecido metástase óssea de câncer de próstata. O osso contém o maior estoque de IGFs no corpo.

O IGF-IR é um hetero-tetrâmero pré-formado contendo duas cadeias alfa e versão

beta covalentemente ligados por alças dissulfureto. As subunidades de receptores são sintetizadas como parte de um único polipeptídeo de cadeia de 180kd, que depois é proteoliticamente transformado em subunidades alfa (130kd) e beta (95kd). Toda a cadeia alfa é extracelular e contém o local para a ligação ao ligante. A cadeia beta possui o domínio transmembrana, o domínio tirosina quinase, e uma extensão C-terminal que é necessária para a diferenciação celular e transformação, mas é dispensável para sinalização de mitógeno e proteção contra apoptose.

IGF-IR é muito semelhante ao receptor da insulina (IR), em especial na sequência da cadeia beta (70% homologia). Devido a esta homologia, estudos recentes têm demonstrado que estes receptores podem formar híbridos contendo um dímero IR e um dímero IGF-IR (Pandini *et al.*, Clin. Canc. Res. 5:1935-19 (1999)). A formação de híbridos ocorre tanto em células normais como transformadas e o conteúdo dos híbridos é dependente da concentração dos dois homodímeros receptores (IR e IGF-IR) dentro da célula. Embora os híbrido receptores sejam compostos de pares IR e IGF-IR, os híbridos se ligam seletivamente a IGFs, com afinidade semelhante a do IGF-IR, e se ligam a insulina apenas fracamente (Siddle e Soos, The IGF System. Human Press, págs. 199-225. 1999). Esses híbridos, portanto podem se ligar a IGFs e converter sinais tanto em células normais como em transformadas.

Um segundo receptor IGF, IGF-IIR, ou receptor manose-6-fosfato (M6P), também se liga ao ligante IGF-II com alta afinidade, mas não apresenta atividade tirosina quinase (Oates *et al.*, Breast Cancer Res. Treat. 47:269-81 (1998)). Porque resulta na degradação da IGF-II, é considerado um escoadouro de IGF-II, antagonizando o crescimento promovendo efeitos deste ligante. A perda do IGF-IIR em células tumorais pode aumentar o potencial de crescimento através da liberação de seu efeito antagonista sobre a ligação do IGF-II com o IGF-IR (Byrd *et al.*, J. Biol. Chem. 274:24408-16 (1999)).

Os receptores de fator de crescimento alfa e beta (PDGFR α e PDGFR β) derivados de plaquetas, são receptores tirosina quinase de tipo III. PDGFR α é crucial para o desenvolvimento e cumpre funções importantes na vida adulta. Por exemplo, camundongos homozigóticos para uma mutação nula morrem durante embriogênese. Em fases posteriores de desenvolvimento, PDGFR α é expresso em muitas estruturas mesenquimais, enquanto células epiteliais adjacentes produzem plaquetas derivadas dos fatores de crescimento (PDGFs). As amostras de tecido normal ou glândulas hiperplásicas da próstata testam negativo para PDGFR α , enquanto tumores primários de próstata e massas esqueléticas de indivíduos correspondentes expressam PDGFR α . Além disso, de linhagens celulares de próstata obtidas a partir de diferentes sítios metastáticos, PDGFR α é encontrado em células PC3 derivadas de metástases óssea, mas não em linhagens celulares obtidas a partir de metástases dos gânglios linfáticos (LNCaP) e cérebro (DU-145).

A família de fatores de crescimento derivada de plaquetas de fatores de crescimento consiste em cinco diferentes dímeros ligados por sulfureto, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, e -DD, que agem através de PDGFR α e PDGFR β . Estes fatores de crescimento são moléculas diméricas compostas de cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfureto que se ligam a dois receptores de proteínas simultaneamente e induzem a dimerização, autofosforilação, e sinalização intracelulares de receptores. PDGFR α e PDGFR β são estruturalmente semelhantes e podem formar heterodímeros bem como homodímeros. Porque PDGFR β não se liga a cadeia de PDGF-A com grande afinidade, PDGF-AA apenas ativa receptores dímeros $\alpha\alpha$, enquanto PDGF-AB e PDGF-CC ativam receptores heterodímeros $\alpha\alpha$ e $\alpha\beta$.

Breve Resumo da Invenção

Esta invenção se refere ao tratamento de tumores primários e metástases ósseas, incluindo tumores originados de próstata, mama, pulmão ou receptor do fator de crescimento I similar à insulina (IGF-IR) e/ou receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α).

Os tumores a serem tratados podem ser hormônio/androgênio-dependentes ou hormônio/androgênio independente, e pode ser originado, por exemplo, de próstata, mama, ou pulmão.

A invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo que tenha um tumor ósseo, bem como os métodos de inibir o crescimento de um tumor ósseo. Os métodos compreendem administrar uma quantidade eficaz de antagonista IGF-IR ou uma quantidade eficaz de um antagonista de PDGFR α . Os antagonistas dos receptores incluem anticorpos e fragmentos de anticorpos, bem como inibidores intracelulares de moléculas pequenas.

A invenção fornece anticorpos anti-IGF-IR ou anti-PDGFR α que se ligam aos seus receptores alvo e inibem a ligação ao ligante. A invenção fornece também anticorpos e outros antagonistas que neutralizam a ativação do IGF-IR ou PDGFR α . Outros certos anticorpos promovem infra-regulação dos seus receptores alvo, por exemplo, por internalização e/ou degradação. Por conseguinte, os anticorpos e antagonistas de moléculas pequenas funcionam inibindo a ativação de moléculas sinalizadoras abaixo, como Akt, p42/p44, e MAPK.

Os métodos incluem o uso de antagonistas IGF-IR ou PDGFR α s sozinhos, em combinação uns com os outros ou em combinação com outros tratamentos para o câncer, como quimioterapia e radioterapia.

A invenção fornece também anticorpos e fragmentos de anticorpos que se ligam a PDGFR α , bem como nucleotídeos e célula hospedeira para a produção de anticorpos. Os anticorpos bloqueiam a ligação ao ligante e neutralizam a ativação de receptores. A invenção também fornece a utilização dos anticorpos sozinhos, em combinação com outros antagonistas de receptores ou agentes antineoplásicos, ou como conjugados para o tratamento

de doença neoplásica. Anticorpos anti-PDGFR α são utilizados para tratar, por exemplo, tumores de ovário, tumores de mama, tumores pulmonares, tumores hepatocelulares, tumores estromais gastrintestinais, melanomas, carcinoma de células renais, tumores de próstata, e sarcomas dos tecidos moles.

5 Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra o crescimento de tumores subcutâneos enxertados LuCaP 35V em camundongos SCDD castrados durante um período de tratamento iniciado quando os tumores tenham atingido 150-200 mm³. O Painei A: controles não tratados; Painei B: os animais foram tratados durante quatro semanas com docetaxel (tanto 10 mg/kg como 20 mg/Kg) isoladamente, ou em combinação com anticorpos anti-IGF-IR (40 mg/Kg IMC-A12);
10 Painei C: níveis séricos de PSA em camundongos SCID não tratados e tratados transportando tumores subcutâneos enxertados LuCaP 35V. Os camundongos tratados receberam docetaxel (20 mg/Kg) isoladamente ou docetaxel (ou 10 mg/kg ou 20 mg/Kg), em combinação com anticorpo anti-IGF-IRs (40 mg/Kg EV1C-A12). O tratamento foi iniciado quando os
15 tumores tinham atingido 150-200 mm³ e encerrado após quatro semanas.

A Figura 2 mostra suspensões de uma única célula de tumores enxertados LuCaP 35V tratados com docetaxel (10 mg/Kg) sozinho (Grupo A) ou em combinação com anticorpos anti-IGF-IR (40 mg/Kg IMC-A12) (Painei B). O campo denominado R1 corresponde a células apoptóticas com DNA fragmentado (aumento de marcação FITC).

20 A Figura 3 mostra a síntese de DNA (absorção de BrDu) nos tumores enxertados após suspensão do tratamento com docetaxel (10 mg/kg ou 20 mg/Kg) sozinho, e em combinação com anticorpo anti-IGF-IRs (40 mg/Kg BVIC-A12).

A Figura 4 descreve a expressão diferencial de genes associados com agressividade com tumor de próstata (TUBB), a resistência à terapia de anti-androgênio (BIRC 5), e
25 indução da apoptose (IGFBP3) na células tumorais da próstata em resposta ao tratamento com docetaxel e A12 e apenas docetaxel.

A Figura 5 mostra níveis séricos de A12 após suspensão do tratamento.

A Figura 6 mostra o peso corporal (uma medida de citotoxicidade geral), de animais saudáveis tratados continuamente com docetaxel (ou 10 mg/kg ou 20 mg/Kg) isoladamente,
30 ou em combinação com anticorpo anti-IGF-IRs (40 mg/Kg MC-A12).

A Figura 7 mostra o efeito do tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR (MC-A12), em PSA produzido em enxertos em camundongos SCID enxertados com células LuCaP 23.1.

A Figura 8 mostra uma série de fotografias de raios-X de camundongos SCID enxertados com Células LuCaP 23.1. Os camundongos A12 receberam 40 mg/mL de BVIC-A12 IP três vezes por semana durante seis semanas. As fotografias raios-X foram feitas no
35 momento do sacrifício.

A Figura 9 mostra níveis de PSA (a) e radiografias representantes (b) de camundongos SCID com enxertos intratibiais de células de próstata humana LuCaP 23.1.

A Figura 10 ilustra o efeito da aspiração da medula óssea humana sobre a atividade de Akt nas células cancerosas de próstata. Os lisados celulares foram submetidos a SDS-PAGE. Para a análise Western blot, as membranas foram borradas com anticorpos alvejando fosfo-Akt (Ser-473, tecnologia de sinalização celular), PDGFR α (R & D Systems) e actina (Sigma). A ligação ao anticorpo primário foi detectada utilizando proteína A ou proteína G conjugada a HRP (Sigma).

A Figura 11 ilustra indução e inibição da fosforilação de AKT em células PC3-ML. O painel A mostra a inibição de fosforilação de Akt dependente da dose de AG-1296 em células expostas a 30 ng/mL PDFG-BB. O Painel B mostra fosforilação de Akt e inibição de 20 μ M AG-1296 em aspirado ósseo. O Painel C mostra a potência do aspirado da medula óssea para induzir fosforilação de Akt em comparação com a potência de uma combinação de 100 pg/mL de PDGF-AA e 100 pg/mL de PDGF-BB. O Painel D compara a magnitude da fosforilação de Akt induzida pelo aspirado de medula óssea, a inibição por AG-1296 da fosforilação de Akt induzida pelo aspirado de medula óssea, e fosforilação de Akt induzida por PDFG-AA + PDFG-BB.

A Figura 12 ilustra a inibição da fosforilação de Akt em células PC3-ML por antagonistas PDGFR α s. Um painel mostra o efeito dependente de dose de anticorpo monoclonal EVIC-3G3 sobre a fosforilação de Akt induzida por 30 ng/mL de PDGF-BB. Os Painéis B e C proporcionam uma comparação dos efeitos de BVIC-3G3 e AG1296 na fosforilação de Akt induzida por medula óssea. O Painel D mostra que a inibição da fosforilação de Akt é dependente do tempo de preincubação de IMC-3G3.

A Figura 13 mostra a ligação do anticorpo ao PDGFR α . A: ligação direta de anticorpos anti-PDGFR α ao domínio extracelular imobilizado do PDGFR α . B: inibição de [^{125} I] PDGF-AA ligado a PDGFR α imobilizado.

A Figura 14 mostra a inibição específica da fosforilação de PDGFR α e moléculas efetoras abaixo.

A Figura 15 mostra inibição de modalidade de [^{3} H] timidina estimulada por PDGF-AA em células PAE Ra por mAbs.

A Figura 16 mostra a inibição da ativação de moléculas efetoras induzida por PDGF-AA abaixo em células SKLMS-1 (A) e U118 (B).

A Figura 17 mostra a inibição da modalidade de [^{3} H] timidina estimulada por PDGF-AA em células U118 (A) e SKLMS-1 (B) por mAbs. A inibição da modalidade de [^{3} H] timidina estimulada por PDGF-AA também é mostrada para células SKLMS-1 (C) e U118 (D).

A Figura 18 mostra efeitos de tratamento dependente da dose de U118 estabelecida (glioblastoma; painel A) e SKLMS-1 (leiomioma; painel B) tumores enxertados em

camundongos sem pêlo.

A Figura 19 mostra a redução da fosforilação de PDGFR α *in vivo* em tumores U118 tratados com anticorpo anti-PDGFR α , em comparação com o tratamento com IgG humana inespecífica.

- 5 A Figura 20 ilustra vetores de expressão GS utilizados para a clonagem de VH derivado de hibridoma humano e genes de regiões variáveis VK e expressão de proteínas completas humanas de cadeia pesada (IgG1) e leve. Os dois vetores foram recombinados como explicado nos Exemplos e o vetor combinado foi transfectado em células NSO.

Descrição Detalhada da Invenção

- 10 A presente invenção se refere ao tratamento de tumores ósseos com anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam ao receptor de fator de crescimento I similar à insulina (IGF-IR). A expressão endócrina de IGF-I é primeiramente regulado pelo hormônio do crescimento e produzido no fígado, mas outros tipos de tecidos também são capazes de exprimir IGF-I, incluindo os ossos, que contém um grande armazenamento de fatores de
- 15 crescimento. Dependendo do tipo de célula tumoral, IGF-I está envolvida na regulação endócrina, parácrina, e/ou autócrina (Yu, H. e Rohan, J., J. Natl. Cancer Inst. 92:1472-89 (2000)).

- Foi descoberto que os anticorpos que se ligam a IGF-IR são úteis em terapias para o tratamento de tumores ósseos que expressam IGF-IR. Os anticorpos podem ser usados
- 20 sozinhos, ou em combinação com outros tratamentos do câncer, particularmente quimioterápicos. A terapia anti-IGF-IR, isoladamente ou em combinação com a terapia com um ou mais agentes anti-neoplásicos (como, por exemplo, quimioterapia ou radioterapia), tem significativa eficácia terapêutica. A supressão de crescimento tumoral é muitas vezes acompanhada por um aumento na apoptose e persiste depois que todo o tratamento é interrompido
- 25 e os tumores começam novamente a crescer em animais tratados apenas com quimioterapia.

- Também foi descoberto que PDGFR α desempenha um papel importante no crescimento de tumores ósseos. Por exemplo, algumas linhagens de células tumorais que expressam PDGFR α preferencialmente metastatizam para o osso. Essas linhagens celulares
- 30 exibem aumento da ativação e fosforilação de PDGFR α em moléculas sinalizadoras abaixo em resposta aos fatores solúveis presentes na medula óssea. A ativação de PDGFR α pela medula óssea é reduzida ou completamente inibida por antagonistas de PDGFR α s, e a fosforilação de moléculas sinalizadoras abaixo que são comumente ativadas por sinais através de PDGFR α e outros sistemas receptores de tirosina quinase é muito reduzida. Alguns da-
- 35 dos sugerem que a via de sobrevivência do PI3K/Akt é ativada pela sinalização de PDGFR α , não só por ligantes que ativam PDGFR α diretamente, mas também por fatores presentes na medula óssea que causam transativação do receptor.

Os tumores ósseos primários a serem tratados de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitados a, osteosarcomas, condrosarcomas, fibrosarcomas, e hemangiosarcomas. Notavelmente, tumores secundários malignos (metastáticos) são muito mais comuns do que os tumores ósseos primários. Os tumores ósseos metastáticos a serem

5 tratados de acordo com a invenção podem surgir a partir de uma variedade de fontes, as mais comuns das quais são cânceres da próstata, mama, ou pulmão. A origem de um câncer metastático ósseo geralmente será aparente a partir do histórico do paciente. Os tumores podem ser osteoblásticos ou osteolíticos. Os tumores podem ser dependentes de estimulação de IGF-IR quando eles surgirem, ou podem transitar para dependência de IGF-IR. Por

10 exemplo, câncer de próstata ou de metástases de câncer de próstata que são inicialmente hormônio/androgênio-dependentes e controláveis pelos tratamentos físicos ou químicos que suprimem a produção de androgênio ou hormonal, pode tornar-se hormônio/androgênio-independentes através do aumento da sensibilidade à estimulação através de IGF-IR. Além disso, além de fornecer o tratamento hormônio/androgênio-independente de tumores, a in-

15 venção pode ser útil no tratamento de tumores ósseos hormônio/androgênio-dependente, sem dependência de repressão do androgênio ou produção hormonal, por exemplo, co-administrando IGF-IR com anticorpos agentes anti-neoplásicos. Tais tumores metastáticos incluiriam tumores ósseos que são estimulados através de IGF-IR no ambiente rico em IGF do osso, que podem ser sensíveis a sensível estimulação hormonal, mas não o suficiente

20 para crescer sem envolvimento de IGF. A ablação do hormônio poderá não ser necessária para esses tumores.

Os tumores ósseos que são PDGF-dependentes também podem ser tratados de acordo com a invenção, assim como tumores, que são "medula óssea"-dependentes. Os tumores medula óssea-dependentes exibem ativação de PDGFR α em resposta a fatores

25 solúveis presentes na medula óssea. Por exemplo, como exemplificado aqui, uma linhagem celular cancerosa metastática expressando PDGFR α humana sofre a ativação de PDGFR α e fosforilação de Akt+ após exposição ao aspirado de medula óssea. Um anticorpo anti-PDGFR α e um antagonista de molécula pequena de PDGFR α , cada um, inibem a ativação de PDGFR α e fosforilação de Akt+ na linhagem celular. Os fatores solúveis na medula ós-

30 sea que ativam PDGFR α incluem, mas não estão limitados a, PDGF-AA e -BB.

Embora tal dependência da medula óssea envolva a sinalização através de PDGFR α ela não pode dizer respeito apenas a ligação da PDGFR α de um ligante PDGFR α . Por exemplo, como exemplificado aqui, deve-se observar que a ativação de PDGFR α definida por ligantes (PDGF-AA-ou BB), é mais fraca do que ativação pelo aspirado de medula ós-

35 sea. Além disso, observa-se que na presença de aspirado de medula óssea, a fosforilação de Akt+ diminui com o aumento do tempo de incubação. No seu conjunto, estes resultados sugerem que além de responder a ligação de PDGFs, PDGFR α pode ser transativado (fos-

forilado) por outros elementos de tradução de sinal (por exemplo, outros receptores de tirosina quinase) sensíveis a outros componentes da medula óssea. Em qualquer caso, em uma linhagem celular adequada para o crescimento do osso metastizado (isto é, uma linhagem celular que preferencialmente metastasize ao osso), a ativação de PDGFR α medula

5 óssea-dependente é observada, a qual é inibida por antagonistas de PDGFR α . Além disso, o tratamento com um antagonista de PDGFR α inibe a estimulação induzida pela medula óssea de via anti-apoptótica de PI3K/Akt e proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK).

Os tumores ósseos a serem tratados com um antagonista de PDGFR α pode surgir como metástases de células do câncer da próstata, e, como referido, pode ser hormônio/

10 androgênio-dependentes, ou ter transferida para hormônio/ androgênio-independência. Tais tumores também podem surgir como metástases de câncer que não o de próstata. Alguém versado na técnica poderia facilmente ser capaz de diagnosticar estas condições e enfermidades usando testes convencionais conhecidos.

Tratamento significa qualquer tratamento de uma doença em um animal e inclui: (1)

15 impedir que a doença ocorra em um mamífero que pode ter predisposição para a doença, mas ainda não experimenta ou exibe sintomas da doença; por exemplo, a prevenção do surgimento de sintomas clínicos; (2) a inibição da doença, como por exemplo, interromper o seu desenvolvimento; ou (3) alívio da doença, como por exemplo, causando regressão dos sintomas da doença. Inibição do crescimento tumoral inclui retardar ou interromper o crescimento, bem como causar regressão tumoral. Uma quantidade eficaz para o tratamento de

20 uma doença significa que a quantidade que, quando administrada a um mamífero na necessidade da mesma, é suficiente para efeito do tratamento, conforme acima definido, para aquela doença. Os antagonistas de IGF-IR e o antagonista de PDGFR α da invenção podem ser administrados em monoterapia, em combinação com uma outra, ou em combinação com

25 um ou mais agentes antineoplásicos, como, por exemplo, um agente quimioterápico ou radioterápico.

Em uma modalidade da invenção, pode ser desejável determinar o nível de expressão de IGF-IR e/ou PDGFR α em um tumor a ser tratada. Nesses casos, as biópsias tumorais podem ser recolhidos e analisadas pelos métodos bem conhecidos na técnica. Em outra

30 modalidade da invenção, o antagonista de IGF-IR ou antagonista de PDGFR α é administrado com base no fato do receptor correspondente ser comumente expresso ou ativado em um determinado tipo de tumor ou invariavelmente torna-se expresso de ativado a medida que a doença progride.

O antagonista de IGF-IR pode ser um antagonista extracelular ou um antagonista

35 intracelular e mais de um antagonista pode ser empregado. Os antagonistas extracelulares incluem, mas não estão limitados a, proteínas ou outras moléculas biológicas que se ligam ao IGF-IR ou a um ou mais dos seus ligantes (por exemplo, IGF-I e IGF-II são ligantes natu-

rais de IGF-IR). Em uma modalidade da invenção, um antagonista extracelular inibe a ligação do IGF-IR para seus ligantes. Em uma modalidade, o antagonista é um anticorpo anti-IGF-IR, como, por exemplo, IMC-A12. Em outra modalidade, o antagonista é um fragmento de IGF-IR solúvel de ligação ao ligante. Os antagonista de IGF-IRs intracelulares podem ser moléculas biológicas, mas são geralmente moléculas pequenas. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, inibidor AGI 024 de tirosina quinase (Calbiochem), inibidor de receptor de fator de crescimento tipo insulina-I quinase NVP-AEW541 (Novartis), bem como inibidor de receptor fator de crescimento-I similar à insulina/insulina BMS-554417 (Bristol Myers Squibb). Será apreciado que uma molécula pequena útil para ser utilizada na invenção são os inibidores de IGF-IR, mas não precisam ser totalmente específicos para IGF-IR.

Os anticorpos anti-IGF-IR a serem utilizados de acordo com o presente invenção apresentam uma ou mais das seguintes propriedades:

1) Os anticorpos ligam-se ao domínio externo do IGF-IR e inibem a ligação do IGF-I ou II de IGF-IGF-IR. A inibição pode ser determinada, por exemplo, através de um ensaio de ligação direta utilizando receptores purificados ou ligados à membrana, na presente modalidade, os anticorpos da presente invenção, ou fragmentos dos mesmos, de preferência se ligam a IGF-IR, pelo menos, tão fortemente como os ligantes naturais de IGF-IR (IGF-I e IGF-II).

2) Os anticorpos neutralizam IGF-IR. A ligação de um ligante, por exemplo, IGF-I ou IGF-II, a um domínio extracelular externo do IGF-IR estimula autofosforilação da subunidade beta e moléculas sinalizadoras abaixo, incluindo MAPK, Akt, e IRS-I.

A neutralização de IGF-IR inclui inibição, diminuição, inativação e/ou ruptura de uma ou mais dessas atividades normalmente associadas com tradução de sinal. A neutralização pode ser determinada *in vivo*, *ex-vivo*, *in vitro* ou utilizando, por exemplo, tecidos, células cultivadas, ou componentes celulares purificados. A neutralização inclui a inibição de heterodímeros IGF-IR/IR bem como homodímeros IGF-IR. Assim, a neutralização de IGF-IR tem vários efeitos, incluindo a inibição, diminuição, inativação e/ou ruptura do crescimento (proliferação e diferenciação), angiogênese (escolha de vaso sanguíneo, invasão e metástases), e motilidade e metástase celular (aderência e invasividade celular).

Uma medida de neutralização de IGF-IR é a inibição da atividade do receptor tirosina quinase. A inibição de tirosina quinase pode ser determinada usando métodos bem conhecidos, por exemplo, através da medição do nível de autofosforilação de receptor de quinase recombinante, e/ou fosforilação de substratos naturais ou sintéticos. Assim, os ensaios de fosforilação são úteis na determinação de anticorpos de neutralização no contexto da presente invenção. Fosforilação pode ser detectada, por exemplo, usando um anticorpo específico para fosfotirosina em um ensaio ELISA ou em um Western blot. Alguns ensaios da atividade de tirosina quinase são descritos em Panek *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 283:

1433-44 (1997) e Batley *et al.*, Life Sd. 62:143-50 (1998). Os anticorpos da invenção provocam uma diminuição na fosforilação de tirosina IGF-IR de, pelo menos, cerca de 75%, de preferência, pelo menos, cerca de 85%, e mais de preferência, pelo menos, cerca de 90% nas células que respondem ao ligante.

- 5 Outra medida de neutralização de IGF-IR é a inibição da fosforilação de substratos de IGF-IR abaixo. Consequentemente, o nível de fosforilação da MAPK, Akt, ou IRS-I pode ser medido. A diminuição na fosforilação é, pelo menos, cerca de 40%, e pode ser, pelo menos, cerca de 60%, ou, pelo menos, cerca de 80%.

- 10 Além disso, os métodos de detecção de expressão de proteínas pode ser utilizado para determinar a neutralização de IGF-IR, onde as proteínas sendo medidas são reguladas pela atividade de tirosina quinase de IGF-IR. Estes métodos incluem imunohistoquímica (IHC) para a detecção de expressão de proteínas, hibridização de fluorescência in loco (FISH), para detecção de amplificação de genes, ensaios de ligação competitiva de radioligantes, técnicas de blot de matriz sólida, como a Northern e Southern blots, reação de
15 cadeia de polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR) e ELISA. Ver, por exemplo, Grandis *et al.*, Cancer, 78:1284-92 (1996); Shimizu *et al.*, Japan J. Cancer Res., 85:567-71 (1994); Sauter *et al.*, Am. J. Path., 148:1047-53 (1996); Collins, GHa 15:289-96 (1995); Radinsky *et al.*, Clin. Cancer Res. 1:19-31 (1995); Petrides *et al.*, Cancer Res. 50:3934-39 (1990); Hoffmann *et al.*, Anticancer Res. 17:4419-26 (1997); Wikstrand *et al.*, Cancer Res.
20 55:3140-48 (1995).

- Ensaio *ex vivo* também podem ser utilizados para determinar a neutralização de IGF-IR. Por exemplo, a inibição dos receptores de tirosina quinase pode ser observada por mitogenico ensaios utilizando linhagens celulares estimuladas com receptores ligante na presença e ausência de inibidor. A linhagem celular de câncer de mama MCF7 (American Type
25 Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) é uma linhagem celular que expressa IGF-IR e é estimulada por IGF-IGF-I ou II. Outro método envolve testes de inibição do crescimento de células tumorais expressando IGF-IR ou células transfectadas para expressar IGF-IR. A inibição também pode ser observada usando modelos tumorais, por exemplo, células tumorais humanas injetadas um camundongo.

- 30 Os anticorpos da presente invenção não estão limitados por qualquer mecanismo especial de neutralização de IGF-IR. Os anticorpos anti-IGF-IR da presente invenção podem se ligar externamente a receptores de IGF-IR de superfície celular, bloqueando a ligação do ligante (por exemplo, IGF-IGF-I ou II) e posterior tradução de sinal mediada por receptores associados a tirosina quinase, e evitar a fosforilação do IGF-IR e de outras proteínas abaixo
35 na cascata de tradução de sinal.

3) Os anticorpos infra-modulam IGF-IR. A quantidade de IGF-IR presente na superfície de uma célula depende da produção de receptores de proteína, internalização e degra-

dação. A quantidade de IGF-IR presente na superfície de uma célula pode ser medida indiretamente, pela detecção da internalização do receptor ou uma molécula ligada ao receptor. Por exemplo, a internalização do receptor pode ser medida pelo contato com células que expressam IGF-IR marcadas com um anticorpo. O anticorpo ligado à membrana é então retirado, recolhido e contado. O anticorpo internalizado é determinado pela lise das células e detecção do marcador no lisado.

Outra maneira é medir diretamente a quantidade do receptor presente na célula após tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR ou outra substância, por exemplo, por análise de ordenação de célula ativada por fluorescência de células marcadas por expressão de superfície de IGF-IR. As células marcadas são incubadas a 37°C e a intensidade de fluorescência é medida ao longo do tempo. Como um controle, uma parte da população marcada pode ser incubada a 4°C (condições em que a internalização de receptor é interrompida).

IGF-IR de superfície celular pode ser detectado e medido utilizando uma diferente anticorpo que é específico para IGF-IR e que não bloqueia ou compete com a ligação do anticorpo sendo testado. (Burtrum, *et al.* Cancer Res. 63:8912-21 (2003)) O tratamento de uma célula expressando IGF-IR com um anticorpo da invenção resulta na redução da superfície celular de IGF-IR. Em uma modalidade preferida, a redução é, no mínimo, cerca de 70%, mais de preferência, pelo menos, cerca de 80%, e ainda mais de preferência, pelo menos, cerca de 90% na resposta ao tratamento com um anticorpo da invenção. A diminuição significativa pode ser observada em menos de quatro horas.

Outra medida da infra-modulação é a redução do total de proteína receptora presente em uma célula, e reflete a degradação dos receptores internos. Consequentemente, o tratamento de células (particularmente as células cancerosas), com anticorpos da invenção resulta em uma redução no total de células IGF-IR. Em uma modalidade preferida, a redução é, no mínimo, cerca de 70%, mais de preferência, pelo menos, cerca de 80%, e ainda mais de preferência, pelo menos, cerca de 90%.

Para o tratamento de seres humanos, os anticorpos de acordo com a invenção são preferencialmente humanos. Alternativamente, os anticorpos podem ser de primatas não humanos ou de outros mamíferos, ou seja anticorpos humanizados ou quiméricos. Em uma modalidade da invenção, um anticorpo anti-IGF-IR compreende uma, duas, três, quatro, cinco, e/ou seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) selecionadas do grupo constituído por SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, e SEQ ID NO: 49 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). Em outra modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR compreende uma, duas, três, quatro, cinco, e/ou seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) selecionados do grupo constituído por SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, e SEQ ID NO: 59 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L,

respectivamente). De preferência, os anticorpos (ou fragmentos deles) da presente invenção têm CDRs de cadeia pesada de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 39. Alternativamente, e também de preferência, os anticorpos presentes incluindo fragmentos, tenham CDRs de cadeia leve de SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 49 ou SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57 e SEQ ID NO: 59. Um desses anticorpos anti-IGF-IR é o anticorpo IgG1 humana IMC-A12 (WO2005016970), com um domínio variável de cadeia pesada representado por SEQ ID NO: 41 e um domínio variável de cadeia leve representado por SEQ ID NO: 51. Outro anticorpo humano preferido é IMC-2F8 (WO2005016970), com um domínio variável de cadeia pesada idêntico ao IMC-A12 e um domínio variável de cadeia leve representado por SEQ ID NO: 61. Anticorpos úteis ainda incluem anticorpos anti-IGF-IRs que competem com MC-A12 ou IMC-2F8 para ligação a IGF-IR, bem como anticorpos que se ligam a outros epítomos (ou seja, anticorpos que se ligam a outros epítomos e exibem propriedades como anteriormente descrita como bloqueio do ligante, internalização do receptor, etc, mas não competem com BVIC-A12 ou IMC-2F8).

De acordo com a invenção, antagonistas de PDGFR α s também podem ser usados para o tratamento. A antagonista de PDGFR α pode ser um antagonista extracelular ou um antagonista intracelular e mais de um antagonista podem ser empregados. Antagonistas extracelulares incluem, mas não estão limitados a, proteínas ou outras moléculas biológicas que se ligam a PDGFR α ou de um ou mais dos seus ligantes (por exemplo, PDGF-AA, -AB, -BB, -CC). Em uma modalidade da invenção, um antagonista extracelular é inibido pela ligação do PDGFR α aos seus ligantes. Em uma modalidade, o antagonista é um anticorpo anti-PDGFR α , como, por exemplo, IMC-3G3. Em outra modalidade, a ligação é uma proteína solúvel a ligação ao ligante fragmento de PDGFR α . Os antagonistas intracelulares de IGF-IRs podem ser moléculas biológicas, mas são geralmente moléculas pequenas. Em uma modalidade, o antagonista intracelular de PDGFR α é AG1296. AG1296 (Calbiochem) é um inibidor da PDGF α , PDGF1Ss, e c-KIT, e também reage com Flt3. Outras moléculas pequenas que o alvo PDGFRs incluir STI-571 (o imatinib mesilato, Gleevec®, Novartis) e SUI 1248 (sunitinib malate, SUTENT®, Pfizer).

Em uma modalidade da invenção, um anticorpo anti-PDGFR α compreende uma, duas, três, quatro, cinco, e/ou seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) selecionadas do grupo constituído por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, e SEQ ID NO: 14 (CDR1H/CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). De preferência, os anticorpos (ou fragmentos deles) da presente invenção têm CDRs de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6. Alternativamente, e também de preferência, os anticorpos presentes, ou fragmentos dos mesmos, tenham CDRs de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14. As seqüências de aminoácidos da CDRs são definidos abaixo na Tabela 1.

Tabela 1-CDRs do IMC-3G3

Cadeia Pesada		
CDR1	SSSYY	SEQ ID NO: 2
CDR2	SFFYTGSTYYNPSLRS	SEQ ID NO: 4
CDR3	QSTYYYGSGNYYGWFD	SEQ ID NO: 6
Cadeia Leve		
CDR1	RASQSVSSYLA	SEQ ID NO: 10
CDR2	DASNRAT	SEQ ID NO: 12
CDR3	QQRSNWPPA	SEQ ID NO: 14

Em outra modalidade, o anticorpo anti-PDGFR α , ou fragmento do mesmo, tem uma região variável humana de cadeia pesada de SEQ ID NO: 8 e/ou de uma região variável humana de cadeia leve de SEQ ID NO: 16. IMC-3G3 é um tal anticorpo e é exemplificado na presente invenção.

De preferência, os anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, da presente invenção neutralizam PDGFR α . A ligação de um ligante, por exemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB ou PDGF-CC, de um domínio extracelular do PDGFR α estimula dimerização do receptor, autofosforilação, ativação do domínio interno citoplasmático do receptor da tirosina quinase, e início de diversas vias de tradução de sinal e transativação envolvidas na regulação da síntese do DNA (ativação genética) e progressão do ciclo celular ou divisão. Os anticorpos anti-PDGFR α tipicamente bloqueiam a ligação aos ligantes e/ou dimerização do receptor, e inibem uma ou mais de autofosforilação, ativação da atividade de tirosina quinase e tradução de sinal. Os anticorpos anti-PDGFR α da presente invenção podem ser específica para a região ligante de ligação extracelular de PDGFR α e impedir a ligação de um ligante de PDGFR α . De preferência, esses anticorpos anti-PDGFR α , ou fragmentos dos mesmos, se ligam a PDGFR α , pelo menos, tão fortemente como os ligantes naturais de PDGFR α . Como alternativa ou adicionalmente, os anticorpos podem ser específicos para uma região do monômero receptor que, de outra forma uma interface dímero receptor. Esses anticorpos bloqueia a formação de dímero, embora a ligação ao ligante de um monômero receptor pode ou não ser bloqueada.

Como descrito acima para anticorpo anti-IGF-IRs, receptor neutralização pode ser determinada por uma variedade de *in vivo*, sendo, *in vitro*, e *ex vivo* métodos. Em uma modalidade da invenção, o anticorpos anti-PDGFR α reduzem a fosforilação de PDGFR α de, pelo menos, cerca de 75%. Em outras modalidades, fosforilação seja reduzida em, pelo menos, cerca de 85% ou, pelo menos, cerca de 90%. Em uma modalidade da invenção, como resultado da inibição da tradução de sinal de PDGFR α , a fosforilação ou um componente da via de tradução de sinal abaixo (por exemplo, Akt, p42/p44, etc) é reduzida em, pelo menos,

cerca de 40%, pelo menos, cerca de 60%, ou, pelo menos, cerca de 80%. A neutralização do receptor pode ser determinada utilizando ligantes definidos (por exemplo, PDGF-AA, -AB, -BB, -CC), misturas de tais ligantes, ou preparações, como aspirado de medula óssea que compõem PDGFs, bem como de outros fatores de crescimento estimuladores.

5 A neutralização de PDGFR α inclui a inibição, diminuição, inativação e/ou ruptura de uma ou mais dessas atividades normalmente associados com a tradução de sinal. Assim, neutralizar PDGFR α tem vários efeitos, incluindo a inibição, diminuição, inativação e/ou perturbações do crescimento (proliferação e diferenciação), angiogênese (escolha do vaso sanguíneo, invasão e metástases), motilidade e metástase celular (aderência celular e inva-

10 sividade).
Ensaio *ex vivo*, como descrito acima, também pode ser utilizado para determinar a neutralização de PDGFR α . Por exemplo, células de leiomiosarcoma SKLMS-1 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD; ATCC HTB-88TM), ou células de glioblastoma U118 (ATCC HTB-15TM) humanas estimuladas com PDGF-AA podem ser utilizadas
15 para o doseamento da inibição de PDGFR α . A inibição do crescimento pode ser determinada utilizando células tumorais humanas expressando PDGFR α injetadas em um camundongo SCID.

A presente invenção não está limitada por qualquer mecanismo especial de neutralização de PDGFR α . Os anticorpos anti-PDGFR α da presente invenção se ligam externa-
20 mente ao Receptor de superfície celular de PDGFR α , bloqueiam a ligação do ligante (por exemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC), inibem fosforilação Do PDGFR α , inibir a tradução de sinal mediada pelo tirosina quinase associada ao receptor, e modulam a atividade de componentes do sinal de tradução abaixo. Os complexo receptor-anticorpo também pode ser internalizado e degradado, resultando na infra-regulação do receptor de
25 superfície celular. As metaloproteínas de matriz, que funcionam na invasão e metástase da célula tumoral, que também podem ser infra-reguladas pelos anticorpos da presente invenção. Além disso, os anticorpos da presente invenção podem apresentar inibição da produção e angiogênese do fator de crescimento.

Como descrito acima, os antagonistas de PDGFR α s da invenção são úteis para o
30 tratamento dos tumores ósseos, incluindo tumores ósseos metastáticos. Outros tipos de tumores que expressam PDGFR α e podem ser tratados de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitados a, tumores do ovário, tumores de mama, tumores pulmonares, tumores hepatocelulares, tumores estromais gastrintestinais, melanoma, carcinoma das células renais, tumores de próstata, e sarcomas dos tecidos moles. Os sarcomas dos tecidos
35 moles são originários de tecidos tais como gordura, músculos, nervos, tendões e vasos sanguíneos e linfáticos. Tipicamente, as células tumorais superexpressam PDGFR α . A expressão de PDGFR α pode ser determinada, por exemplo, através da análise histoquímica ou de

RNA. Por exemplo, um análise de scatchard de ligação de células IMC-3G3 de U118 e células tumorais SKLMS-1 radiomarcadas indica que o número de moléculas de PDGFR α nas células é de cerca de 500 e 2500, respectivamente.

Os antagonista de PDGFR α s funcionam inibindo a tradução de sinal por PDGFR α expresso sobre as células tumorais, ou pela inibição de PDGFR α , expresso em células estromais circundantes que de outro modo sofrem estimulação parácrina por PDGFs expresso de células tumorais. Assim, anticorpos, como IMC-3G3 e outros antagonistas de PDGFR α s são úteis para o tratamento dos tumores caracterizados por estimulação autócrina e/ou parácrina do PDGFR α .

Fragmentos de anticorpos, de acordo com a invenção pode ser produzidos clivando um anticorpo inteiro, ou por expressão de DNA que codifica o fragmento. Fragmentos de anticorpos podem ser preparados por métodos descritos por Lamoyi *et al.*, J. Immunol. Methods, 56: 235-243 (1983) e por Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983). Esses fragmentos podem conter um ou ambos fragmento Fab ou fragmento F(aB')₂. Esses fragmentos podem também conter anticorpos de região variável de fragmento de cadeia única, ou seja, scFv, dicorpos, ou outros fragmentos de anticorpos. Métodos de produção de tais equivalentes funcionais são divulgados no Pedido PCT WO 93/21319, Pedido de Patente Européia No. EP 239400; Pedido PCT WO 89/09622; Pedido de Patente Européia No. EP 338745; e Pedido de Patente Européia No. EP 332424.

As células hospedeiras preferidas para a transformação de vetores e expressão dos anticorpos da presente invenção são células de mamíferos, por exemplo, células COS-7, células de ovário de hamster chinês (CHO), e linhagens celulares de origem linfóide, como células de linfoma, mieloma (ex NSO), ou hibridoma. Outros anfitriões eucarióticos, tais como leveduras, podem ser utilizados como alternativa.

Sempre que for desejado expressar um gene construído na levedura, uma seleção genética adequada para uso na levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7. Stinchcomb *Et al.* Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979). O gene *trp1* proporciona uma seleção marcadora para uma cepa mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44076 ou PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). A presença da lesão *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura, em seguida, fornece um meio eficaz para detectar a transformação pelo crescimento na ausência de triptofano. Do mesmo modo, cepas de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20622 ou 38626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que contenham o gene *Leu2*.

As células hospedeiras transformadas são cultivadas por métodos conhecidos na técnica em um meio líquido contendo fontes assimiláveis de carbono (carboidratos, como a glicose ou de lactose), nitrogênio (aminoácidos, peptídeos, proteínas ou os seus produtos de

degradação, como peptonas, sais de amônio ou similares), e sais inorgânicos (sulfatos, fosfatos e/ou carbonatos de sódio, potássio, magnésio e cálcio). O médio ainda contém, por exemplo, promover o crescimento-substâncias, como os oligoelementos, por exemplo, ferro, zinco, manganês e similares.

5 Os anticorpos de alta afinidade anti-PDGFR α e anti-IGF-IRs, de acordo com a presente invenção podem ser isolados de uma biblioteca de exibição de fagos construída a partir de genes de regiões variáveis humanas de cadeia pesada e leve. Por exemplo, um domínio variável da invenção pode ser obtido a partir de um linfócitos de sangue periférico que contém um gene de região variável rearranjado. Alternativamente, as porções de domínio
10 variável, como regiões CDR e FW, podem ser obtidas a partir de diferentes fontes e recombinadas. Além disso, as porções do domínio variável (por exemplo, regiões FW) podem ser sequências sintéticas consensuais.

Os anticorpos e fragmentos dos anticorpos presentes invenção pode ser obtido, por exemplo, a partir de anticorpos de ocorrência natural, ou bibliotecas de exibição de fagos
15 Fab ou scFv. Entende-se que, para fazer um anticorpo de domínio único de um anticorpo que inclua um domínio MP e VL, certas substituições de aminoácidos fora das CDRs podem ser pretendida para reforçar a ligação, expressão ou solubilidade. Por exemplo, pode ser desejável modificar resíduos de aminoácidos que de outra forma seriam enterradas na interface VH-VL.

20 Além disso, anticorpos e fragmentos de anticorpos da invenção podem ser obtidos por tecnologia padrão de hibridomas (Harlow & Lane, edição., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que está incorporada neste documento por referência), utilizando camundongos transgênicos (por exemplo, camundongos KM de Medarex, San Jose, na Califórnia), que produzem imunoglobulina humana de cadeia pesada gama e
25 leve kapa, em uma modalidade preferida, uma parte substancial do genoma de produção de anticorpos humanos é inserido no genoma do camundongo, e se torna deficiente na produção de anticorpos murinos endógenos. Esses camundongos podem ser imunizados por via subcutânea (sc), com PDGFR α (normalmente em adjuvante de Freund completo), com impulsos, conforme necessário. Os métodos de imunização são bem conhecidos na técnica.
30 As proteínas usadas para identificar a ligação de IGF-IR aos anticorpos da invenção é preferencialmente IGF-IR e, ainda mais de preferência, é o domínio extracelular do IGF-IR. As proteínas usadas para identificar a ligação de PDGFR α aos anticorpos da invenção é preferencialmente PDGFR α e, ainda mais de preferência, é o domínio extracelular do PDGFR α . Esses domínios extracelulares pode ser livres ou conjugados com outras moléculas.

35 A presente invenção fornece também polinucleotídeos isolados codificando os anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, descrito anteriormente. Detalhes de anticorpos IMC-A12 anti-IGF-IRs são divulgados em WO2005016970. A Tabela 2 expõe as sequências de

ácidos nucleicos para MC-3G3.

Tabela 2 - Sequências de Nucleótidos Codificando CDRs do IMC-3G3

Cadeia Pesada		
CDR1	agtagtagtt actac	SEQ ID NO: 1
CDR2	agtttcttt atactgggag cacctactac aaccggtccc tcaggagt	SEQ ID NO: 3
CDR3	cagtccacgt attactatgg ttcggggaat tattatggct ggttcgaccg c	SEQ ID NO: 5
Cadeia Leve		
CDR1	agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc	SEQ ID NO: 9
CDR2	gatgcatcca acagggccac t	SEQ ID NO: 11
CDR3	cagcagcgta gcaactggcc tccggcg	SEQ ID NO: 13

O DNA codificando anticorpos humanos pode ser obtido por recombinação do DNA humano codificando regiões constantes e regiões variáveis, que não as CDRs, derivado substancialmente ou exclusivamente das regiões de anticorpos humanos correspondente e DNA codificando CDRs resultantes de um humano (SEQ ID NOS: 1, 3, E 5 para CDRs de domínio variável de cadeia pesada e SEQ ID NOS: 9, 11, e 13 para CDRs de domínio variável de cadeia leve).

As fontes adequadas de DNAs que codificam fragmentos de anticorpos incluem qualquer célula, como células de hibridoma e baço, que expressam o anticorpo completo. Os fragmentos podem ser utilizados por si sós como anticorpos equivalentes, ou podem ser recombinados em equivalentes, como descrito acima. As supressões e recombinações de DNA descritas nesta seção podem ser realizadas por métodos conhecidos, tais como os descritos nas publicações acima listadas no que se refere às equivalências de anticorpos e/ou outra técnica padrão recombinante de DNA, tais como as descritas a seguir. Outra fonte de DNAs são os anticorpos de cadeia única produzidos a partir de uma biblioteca de exibição de fagos, como é conhecido na técnica.

Além disso, a presente invenção proporciona vetores de expressão contendo as sequências polinucleotídicas anteriormente descritas operavelmente ligada a uma sequência de expressão, uma sequência promotora e uma melhoradora. Uma variedade de vetores de expressão para a síntese eficaz de anticorpos polipeptídeo em procariotas, tais como bactérias e sistemas eucarióticos, incluindo, mas não limitado a, cultura de células de levedura e sistemas mamíferos foram desenvolvidas. Os vetores da presente invenção podem incluir segmentos de sequências de DNA cromossômico, não-cromossômico e sintético.

Qualquer vetor de expressão adequado pode ser usado. Por exemplo, vetores de

clonagem procariotas incluem plasmídeos de *E. Coli*, como colEI, pCRI, pBR322, pMB9, pUC, pKSM, e RP4. Vetores procariotas também incluir derivados de fago DNA tais como M13 e outros filamentosos únicos-ociosos DNA fagos. Um exemplo de um vetor útil em levedura é um plasmídeo de 2 μ . Vetores de expressão adequados nas células dos mamíferos incluem derivados bem conhecidos de SV40, adenovírus, sequências de DNA derivadas de retrovírus e vetores de iniciação derivados de combinação de vetores funcionais mamíferos, tais como os acima descritas, e plasmídeos funcionais e DNA de fago.

Vetores de expressão eucariotas adiconais são conhecidos na técnica (por exemplo, P.J. Southern and P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341 (1982); Subramani *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 854-864 (1981); Kaufmann and Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," *J. Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982); Kaufmann and Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159, 601-664 (1982); Scahill *et al.*, "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 80, 4654-4659 (1983); Urlaub and Chasin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77, 4216-4220, (1980).

Os vetores de expressão úteis na presente invenção contêm pelo menos uma sequência de expressão controle que é operativamente ligada a sequência de DNA ou fragmento a ser expresso. A sequência controle é inserida no vetor, a fim de controlar e de regular a expressão da sequência clonada de DNA. Exemplos de sequências de expressão controle úteis são o sistema lac, o sistema trp, o sistema tac, o sistema trc, regiões lambda de fago operador e promotor principais, a região de controle fd de proteína de revestimento, o promotores glicolíticos de leveduras, por exemplo, o promotor para 3-fosfoglicerato quinase, os promotores de ácido fosfatase de levedura, por exemplo, Pho5, os promotores de fatores mating alfa de levedura, promotores e derivados de poliomá, adenovírus, retrovírus, e vírus símios, por exemplo, promotores prematuros e tardios ou SV40, e outras sequências conhecidas por controlar a expressão de genes de procariotas ou células eucariotas e seus vírus ou combinações dos mesmos.

A presente invenção fornece também células hospedeiras recombinante contendo os vetores de expressão descritos anteriormente. Anticorpos da presente invenção podem ser expresso em linhagens celulares diferentes de hibridomas. Ácidos nucleicos, que compreendem uma sequência que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção, podem ser usados para transformação de uma célula hospedeira mamífera adequada.

Linhagens celulares de especial preferência são selecionadas com base no alto nível de expressão, expressão constitutiva da proteína de interesse e contaminação mínima de proteínas de acolhimento. As linhagens celulares mamíferas disponíveis como hospedeiras para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem muitas linhagens celulares imortalizadas, tais como, mas não limitado a, células NSO de Ovário de Hamster Chinês

(CHO) células, células de rim de filhotes de Hamster (BHK) e muitas outras. Células eucariotas adicionais adequado incluem leveduras e outros fungos. Anfítrios procariotas úteis incluem, por exemplo, *E. Coli*, tais como *E. Coli* SG-936, *E. Coli* MP 101, *E. Coli* W3110, *E. Coli* X1776, *E. Coli* X2282, *E. Coli* DHI, e *E. Coli* MRCI, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tais como

5 *Bacillus subtilis*, e *Streptomyces*.

Essas células hospedeiras recombinantes presentes podem ser utilizadas para produzir um anticorpo, ou fragmento do mesmo, cultivando as células, em condições que permitam a expressão do anticorpo ou fragmento do mesmo e purificar o anticorpo ou fragmento do mesmo a partir da célula hospedeira ou meio em torno da célula hospedeira. O alveja-

10 mento do anticorpo expresso ou fragmento para secreção nas células hospedeiras recombinantes pode ser facilitado pela inserção de uma sequência codificando um peptídeo líder sinal ou secretor (ver, Shokri *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. 60(6):654- 64 (2003), Nielsen *et al.*, Prot. [Epsilon]ng. 10:1-6 (1997) e von Heinje *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:4683-4690 (1986)), na extremidade 5' do gene de codificação do Anticorpo de interesse. Estes elemen-

15 tos peptídeos líder secretores podem ser obtidos a partir quer procariotas ou eucariotas sequências. Assim sendo devidamente, peptídeos líder secretores são utilizados, sendo os aminoácidos ligados à extremidade N-terminal de um polipeptídeo para direcionar o movimento do polipeptídeo para fora do citosol da célula hospedeira e secreção no meio.

Os anticorpos desta invenção podem ser fundidos a resíduos de aminoácido adicionais. Tais resíduos de aminoácidos podem ser um peptídeo marcador, talvez para facilitar

20 o isolamento. Outros resíduos de aminoácidos para abrigar os anticorpos específicos para órgãos ou tecidos são também contemplados.

Em outra modalidade, um anticorpo da presente invenção é feito expressando um ácido nucleico codificando o anticorpo em um animais transgênicos, de tal forma que o anti-

25 corpo é expressa e podem ser recuperados. Por exemplo, os anticorpos podem ser expressos em um tecido específico forma que facilite a recuperação e purificação. Em uma dessas modalidades, um anticorpo da invenção é expresso na glândula mamária de secreção durante o aleitamento. Animais transgênicos, incluem, mas não estão limitados a camundongos, cabra, e coelho.

Anticorpos que podem ser usados de acordo com a invenção incluem imunoglobulinas completas, fragmentos de imunoglobulinas de ligação a antígeno, bem como proteínas de ligação a antígeno que compõem domínios de ligação a antígeno de imunoglobulinas. Fragmentos de imunoglobulinas de ligação a antígeno incluem, por exemplo, Fab, Fab', e F(aB')₂. Outros formatos anticorpos foram desenvolvidos que mantêm a ligação especifici-

35 dade, mas possuem outras características, que podem ser desejáveis, incluindo, por exemplo, biespecificidade, multivalência (mais de dois sítios de ligação), tamanho compacto (por exemplo, domínios de ligação sozinhos).

Anticorpos de cadeia única não tem alguns ou todos os domínios constantes do conjunto de anticorpos que são derivados. Portanto, eles podem superar alguns dos problemas associados com o uso de qualquer anticorpos. Por exemplo, anticorpos de uma cadeia tendem a ser livres de certas interações indesejadas entre regiões constantes de cadeia pesada e outras moléculas biológicas. Além disso, anticorpos de uma cadeia são consideravelmente menores do que qualquer anticorpo e pode ter uma maior permeabilidade do que qualquer anticorpo, permitindo que anticorpos de cadeia única se localizem e se liguem a sítios de ligação do antígeno-alvo de forma mais eficiente. Além disso, a dimensão relativamente pequena dos anticorpos de cadeia única torna-os menos susceptíveis de provocar um comportamento indesejado resposta imunitária em um receptor de todo anticorpos.

Diversos anticorpos de cadeia única, cada um com uma única cadeia VH e um domínio VL covalentemente ligados por um primeiro peptídeo ligante, pode ser covalentemente ligado, pelo menos, por uma ou mais peptídeo ligante para formar um anticorpo multivalente de cadeia única, que pode ser monoespecífico ou multiespecífico. Cada cadeia de um anticorpo de cadeia única multivalente inclui uma variável cadeia leve fragmento e um fragmento variável de cadeia pesada, e está ligado por um peptídeo ligante para pelo menos uma outra cadeia. O peptídeo ligante é composto de, pelo menos, quinze aminoácido resíduos. O número máximo de aminoácido resíduos é de cerca de cem. Dois anticorpos de cadeia única podem ser combinados para formar uma diacorpo, também conhecido como um bivalente dímero. Diacorpos têm duas cadeias e dois sítios obrigatório, e pode ser monoespecífico ou biespecífico. Cada cadeia de diacorpo inclui um domínio VH conectado a um domínio VL. Os domínios estão relacionados com ligantes que são suficientemente curtos para evitar emparelhamento entre domínios na mesma cadeia, assim dirigindo o emparelhamento entre os domínios complementares sobre diferentes cadeias de recriar os dois locais de ligação a antígenos.

Três anticorpos de cadeia única podem ser combinados para formar triacorpos, conhecido também como trímeros trivalentes. Triacorpos são construídos com a extremidade de aminoácido de um domínio VL ou VH diretamente ou fundidos para a extremidade de um domínio VL ou VH carboxila, ou seja, sem qualquer seqüência ligadora. O triacorpo tem três cabeças Fv com os polipeptídeos arranjados em uma cíclico, de modo cabeça-a-cauda. Uma possível conformação do triacorpo é planar com os três sítios de ligação localizados em um plano em um ângulo de 120 graus entre si. Triacorpos pode ser monoespecíficos, biespecíficos ou triespecíficos.

Assim, anticorpos da invenção e fragmentos desse incluem, mas não estão limitados a, naturalmente anticorpos, tais como fragmentos bivalente (Fab')₂, monovalentes, como fragmentos Fab, anticorpos de cadeia única, Fv cadeia única (scFv), único domínio Anticorpos, multivalent anticorpos de cadeia única, diacorpos, triacorpos, bem como os que se

ligam especificamente com antígenos.

Os anticorpos anti-IGF-IR e anti-PDGFR α ou fragmentos de anticorpos, que podem ser internalizados mediante ligação a células carregando IGF-IR (WO2005016970) ou PDGFR α , podem ser quimicamente ou biosinteticamente ligados a agentes anti-tumorais. Agentes anti-tumorais ligados a este tipo de anticorpos incluem quaisquer agentes que destroem ou danificam um tumor para que o anticorpo tem ligação ou no ambiente da célula para o qual o anticorpo tem ligação. Por exemplo, um agente anti-tumoral é um agente tóxico, como um agente quimioterápico ou de um radioisótopo. Agentes quimioterapêuticos adequados são conhecidos por aqueles versados na técnica e incluem antraciclinas (ex daunomicina e doxorrubicina), metotrexato, vindesina, neocarzinostatina, cisplatina, clorambucil, citosina arabinosideo, 5-fluoruridina, melfalano, ricina e caliqueamicina. Os agentes quimioterapêuticos são conjugados com o anticorpo utilizando métodos convencionais (Ver, por exemplo, Hermentin e Seiler, Behring Inst. Mitt. 82:197-215 (1988)).

Radioisótopos adequados para uso como agentes anti-tumoral também são conhecidos por aqueles hábeis na técnica. Por exemplo, eu ¹³¹I ou ²¹¹At é usado. Esses isótopos são anexados ao anticorpo utilizando técnicas convencionais (Ver, por exemplo, Pedley *et al.*, Br. J. Cancer 68, 69- 73(1993)).

Alternativamente, o agente anti-tumoral que está ligado ao anticorpo é uma enzima que ativa um pró-fármaco. Desta forma, um pró-fármaco é administrado para permanecer em sua forma inativa até que ele atinja a meta local onde é convertido para sua forma de citotoxina. Na prática, o conjugado anticorpo-enzima é administrado ao paciente e permitiu a localização na região do tecido a ser tratado. O pró-fármaco é então administrado ao paciente, para que a conversão para o fármaco citotóxico ocorra na região do tecido a ser tratado.

Outros agentes anti-tumorais medicamentos incluem citocinas, como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O anticorpo alveja a citocina ao tumor, a fim de que a citocina mediem os danos ou destruição dos tecidos tumorais sem afetar os demais. A citocina pode ser conjugado com o anticorpo no DNA, utilizando técnicas convencionais de DNA recombinante.

Em certas modalidades da invenção, o anti-IGF-IR ou anticorpos anti-PDGFR α são administrados em combinação com um ou mais agentes anti-neoplásicos. Para exemplos de terapias de combinações, ver, por exemplo, Patente US nº. 6.217.866 (Schlessinger *et al.*) (Anti-EGFR antibodies in combination with anti-neoplastic agents); WO 99/60023 (Waksal *et al.*) (Anti-EGFR antibodies in combination with radiation). Qualquer agente anti-neoplásica adequado pode ser usado, como um agente quimioterápico, as radiações ou combinações dos mesmos. O agente anti-neoplásico pode ser um agente alquilante ou um anti-metabólito. Exemplos de agentes alquilantes incluem, mas não estão limitados a, cisplatina, ciclofosfamida, melfalan, e dacarbazina. Exemplos de anti-metabólitos incluem, mas não se

limitando a, doxorubicina, daunorubicin, e paclitaxel, gemcitabina.

Agentes anti-neoplásicos úteis também incluem inibidores de mitose, como taxanos, docetaxel e paclitaxil. Inibidores da topoisomerase são outra classe de agentes anti-neoplásicos medicamentos que podem ser usados em combinação com anticorpos da invenção. Estes incluem inibidores da topoisomerase I ou topoisomerase II. Inibidores da topoisomerase I incluem irinotecano (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecano. Inibidores da topoisomerase II incluem etoposido (VP-16), e teniposido (VM-26). Outras substâncias estão atualmente a ser avaliadas em relação a atividade inibitória de topoisomerase e eficácia como agentes antineoplásicos. Em uma modalidade preferida, o inibidor da topoisomerase é irinotecano (CPT-II). Em um determinado incorporação da invenção, um anticorpo anti-IGF-IR é administrado em combinação com docetaxel. Em outra modalidade da invenção, um anticorpo anti-PDGFR α é administrado em associação com doxorubicina.

Quando o agente anti-neoplásico direito é radiação, a fonte de radiação pode ser tanto externa (feixe externo de radiação terapia-EBRT) ou interna (braquiterapia-BT), para o paciente a ser tratado. A dose de agente anti-neoplásico administrada depende de vários fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de agente, o tipo e gravidade tumoral a ser tratado e da via de administração do agente. Deve-se enfatizar, no entanto, que a presente invenção não se limita a uma determinada dose.

Os tratamentos com anticorpos (anticorpos anti-IGF-IR ou anti-PDGFR α) e anticorpos mais agente anti-neoplásico também podem ser utilizados para os pacientes que recebem terapia adjuvante hormonal (por exemplo, para o câncer da mama) ou terapia de privação de androgênio (por exemplo, câncer de próstata).

Antagonistas anti-IGF-IR e anti-PDGFR α s da invenção podem ser co-administrados, ou administrados com antagonistas do receptor que neutraliza outros receptor envolvidos no crescimento tumoral ou angiogênese. Por exemplo, em uma modalidade da invenção, um anticorpo anti-IGF-IRs e um anticorpo anti-PDGFR α são coadministrados, em uma modalidade, em que uma célula tumoral alvo manifesta tanto IGF-IR e PDGFR α , elementos comuns da tradução de sinal são ativados por tradução de sinal através de cada receptor. Embora a inibição de um receptor geralmente resulte em diminuição da ativação dos componentes comuns abaixo, a inibição da ativação ambos os receptor vai diminuir ainda mais. Em outra modalidade, certas células tumorais ou de um tecido circundante expressar quantidades significativas de um receptor, e outras células expressam valores significativos da segunda receptor. A co-administração dos antagonistas reduz o crescimento das células tumorais e parácrina estimulação das células circundantes.

Um anticorpo biespecífico podem ser fornecidos como um alternativa a co-administração. A variedade de anticorpos biespecíficos que existem são concebidos para

incorporar diversas características desejáveis. Por exemplo, diacorpos biespecíficos têm tamanho mínimo. Anticorpos biespecíficos com quatro sítios de ligação a antígenos (dois para cada especificidade de ligação) têm carácter de avidativos de ligação de que são semelhantes aos dos anticorpos naturais correspondentes. Certas regiões de anticorpos biespecíficos incorporam Fc, assim mantendo efectoras funções (por exemplo, completar citotoxicidade dependente (CDC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)), de anticorpos naturais. WO 01/90192 descreve anticorpos tetravalente similares a IgG WO2006/020258 descreve um anticorpo tetravalente que integra dois diacorpos e mantém funções efectoras.

Em outra modalidade, um anticorpo anti-IGF-IR ou um anticorpo anti-PDGFR α ou outro antagonista é usado em combinação com um antagonista de receptor que se liga especificamente a um receptor do fator de crescimento epidérmico (por exemplo, EGFR, Her2/erbB2, erbB3, erbB4). Especialmente preferidas são as ligações antígeno-proteínas que se ligam ao domínio extracelular do EGFR e bloqueam a ligação de um ou mais dos seus ligantes e/ou neutralizam ativação induzida por ligante do EGFR. Antagonistas de EGFR também incluem anticorpos que se ligam a um ligante de EGFR e inibe a ligação do EGFR a seu ligante. Ligantes EGFR incluem, por exemplo, EGF, TGF- α , amfiregulina, EGF de ligação a heparina (HB-EGF) e betacelulina. Pensa-se que EGF e TGF- α sejam os principais ligantes endógenos que resultam em estimulação EGFR-mediada, embora TGF- α tem mostrado ser mais potente na promoção da angiogênese. Antagonista de EGFRs também incluir as substâncias que inibem dimerização de EGFR com outras subunidades de receptor de EGFR (ou seja, EGFR homodímeros) ou heterodimerização com outros receptor fator do crescimento (por exemplo, HER2). Antagonista de EGFRs incluir novas moléculas biológicas e moléculas pequenas, como o sintético quinase inibidores que atuam diretamente no domínio citoplasmático do EGFR para inibir EGFR-mediada tradução de sinal. Erbitux[®] (o cetuximab) é um exemplo de que se liga ao Antagonista de EGFR EGFR e bloqueia a ligação ao ligante. Um exemplo de uma molécula pequena antagonista EGFR é IRESSA[™] (ZD1939), que é um quinozalina derivativo que funciona como um ATP-mimético para inibir EGFR. Veja Patente US nº. 5.616.582 (Zeneca Limited); WO 96/33980 (Zeneca Limited) na p. 4; veja também, Rowinsky et al, Abstract 5 apresentado no 37th Annual Meeting of ASCO, São Francisco, CA, 12-15 de maio de 2001; Anido et al, Abstract 1712 apresentado no 37th Annual Meeting of ASCO, São Francisco, CA, 12-15 de maio de 2001. Outro exemplo de uma molécula pequena antagonista de EGFR é Tarceva[®] (OSI-774), que é um derivado de 4-(fenilamina-substituída)quinozalina [cloridrato de 6,7-Di(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)amina] inibidor de EGFR. Veja WO 96/30347 (Pfizer Inc.) em, por exemplo, na página 2, linha 12, até a página 4, linha 34, página 19, linhas 14-17. Veja também Moyer *et al.*, Cancer Res., 57: 4838-48 (1997); Pollack *et al.*, J. Pharmacol, 291: 739-48 (1999). Tarceva[®]

pode funcionar através da inibição da fosforilação de EGFR e suas vias de tradução de sinal abaixo PI3/Akt e MAP (proteína mitógena ativada) quinase resultando em p27-mediada célula-ciclo detenção. Veja Hidalgo et al-Abstract 281 apresentado no 37th Annual Meeting of ASCO, São Francisco, CA, 12-15 de Maio de 2001.

5 Outras moléculas pequenas também foram relatadas por inibir EGFR, muitas das quais pensa-se serem específicas para o domínio tirosina quinase de um EGFR. Alguns exemplos desses pequenos molécula Antagonista de EGFRs são descritos no WO 91/116051, WO 96/30347, WO 96/33980, WO 97/27199 (Zeneca Limited). WO 97/30034 (Zeneca Limited), WO 97/42187 (Zeneca Limited), WO 97/49688 (Pfizer Inc.), WO 98/33798
 10 (Warner Lambert Company), WO 00/18761 (American Cyanamid Company), e WO 00/31048 (Warner Lambert Company). Exemplos específicos de antagonista de EGFRs de molécula pequena incluir CI-1033 (Pfizer), que é uma quinoxalina (N-[4-(3-cloro-4-fluórfenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-Quinazolin-6-il]-acrilamida) inibidora da tirosina quinase, particularmente EGFR e é descrita em WO 00/31048 na página 8, linhas 22-6; PKI 66 (Novartis),
 15 que é uma pirrolopirimidina inibidor do EGFR e é descrito Em WO 97/27199 às páginas 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), o qual é um inibidor do EGFR e HER2; EKB569 (Wyeth), que é relatada por inibir o crescimento de células tumorais que superexpressam EGFR ou HER2 *in vitro* e *in vivo*; AG-1478 (Trifostina), que é uma quinazolina de molécula pequena que inibe a sinalização de ambos os EGFR e erbB-2; AG-1478 (Sugen), que é um bisubstrato inibidor que também inibe a proteína quinase CK2; PD 153035 (Parke -Davis), que é relatada por inibir atividade EGFR quinase e crescimento tumoral, induzir a apoptose nas células em cultura, e valorizar a citotoxicidade de agentes quimioterapêuticos citotóxicos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que é um inibidor da tirosina quinase direcionado para o tratamento do câncer de próstata; CP-546.989 (OSI Pharmaceuticals), que é declaradamente um inibidor da angiogênese para o tratamento de tumores sólidos; ADL-681, que é um inibidor da quinase EGFR direcionados para o tratamento do câncer; PD 158780, que é um piridopirimidine que é relatado para inibir a taxa de crescimento do tumor A4431 enxertado em camundongos; CP-358774, que é um quinoxaline que é relatado para inibir autofosforilação em HN5 enxertado em camundongos; ZD 1839, que é uma quinoxalina que é relatada a ter atividade antitumoral no camundongo enxertado modelos incluindo os cânceres vulvar, NSCLC, próstata, ovário, e colo-retais; CGP 59326A, que é uma pirrolopirimidina que é relatada para inibir o crescimento do EGFR-positivos enxertado em camundongos; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 e CGP53353 (Novartis), que são dianilnoftalimidas. Derivados naturalmente de inibidores de EGFR de tirosina quinase incluem genisteína, herbimicina A, quercetina, e
 35 erbstatina.

Outras moléculas pequenas relatadas por inibir EGFR e que são, portanto, dentro do âmbito da presente invenção são compostos tricíclicos tais como os compostos descritos

na Patente US nº. 5679683; derivados de quinazolina, como os derivados descritos na Patente US nº. 5616582; e compostos de indol tais como os compostos descritos na Patente US nº. 5196446.

Outro receptor que podem ser direcionados ao longo de IGF-IR ou PDGFR α é um receptor vascular do fator de crescimento do endotélio (VEGFR). Em uma modalidade da presente invenção, um anticorpo anti-IGF-IR ou anti-PDGFR α Anticorpo é usado em combinação com um antagonista de VEGFR. Em uma modalidade, um antagonistas usados que liga-se especificamente ao receptor de VEGFR-1/Flt-1. Em outra modalidade, o VAntagonista de EGFR liga-se especificamente ao VEGFR-2/KDR receptor. Especialmente preferidos são a ligações antígeno-proteínas que se ligam ao domínio extracelular do VEGFR-1 ou VEGFR-2 e bloqueiam a ligação pelos seus ligantes (VEGFR-2 é mais fortemente estimulada pelo VEGF, VEGFR-1 é mais fortemente estimulada pelo PlGF, mas também Por VEGF) e/ou neutralizar induzida por ligante induzido ativação. Por exemplo, IMC-1121 é um anticorpo que se liga aos humanos e neutraliza VEGFR-2 (WO 03/075840; Zhu). Outro exemplo é MAb 6,12 que se liga a VEGFR-1 solúvel expresso na superfície das células e ScFv 6,12 compreende os domínios VL e VH do camundongo anticorpo monoclonal MAb 6,12. A linhagem de células de hibridomas produtores MAb 6,12 tenha sido depositado no ATCC número PTA-3344 ao abrigo das disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para efeitos de Procedimento de Patentes e os regulamentos correspondentes (Budapest Treaty). Em outra modalidade, o VAntagonista de EGFR liga-se a uma VEGFR ligante e blocos ativação de um VEGFR pela ligante. Por exemplo, Avastina (bevacizumab) ® é um anticorpo que se liga ao VEGF.

Outros exemplos de receptores de fator de crescimento envolvidos na tumorigênese são fator de crescimento nervoso (NGFR), e fator de crescimento de fibroblasto (FGFR).

Em mais uma modalidade alternativa, os anticorpos anti-IGF-IR e anti-PDGFR α tanto podem ser administrados em combinação com um ou mais adjuvantes adequados, tais como, por exemplo, citocinas (IL-10 e IL-13, para Exemplo) como de outros estimuladores imunes, tais como, mas não limitado a, quimiocina, antígenos tumorais associados, e peptídeos. Ver, por exemplo, Larrivee *et al.*, Supracitado. Deverá ser apreciado, no entanto, que a administração de apenas um anticorpo anti-IGF-IR ou anti-PDGFR α é suficiente para impedir, inibir, ou reduzir a progressão tumoral de modo terapeuticamente eficaz.

Em uma terapia combinada, o anticorpo anti-IGF-IR ou anti-PDGFR α é administrado antes, durante ou depois da terapia com um outro agente, bem como qualquer combinação, ou seja, antes e durante, antes e depois, Durante e depois, ou antes, durante e depois inicia o processo agente anti-neoplásico terapia. Por exemplo, o anticorpo pode ser administrado entre 1 e 30 dias, de preferência 3 e 20 dias, mais de preferência entre 5 e 12 dias antes de iniciar a terapia por radiação. Em uma modalidade preferida da invenção, é admi-

nistrado concomitantemente com quimioterapia ou, ainda mais de preferência, para posterior terapia com anticorpo.

Na presente invenção, qualquer método adequado ou rota pode ser utilizado para administrar anticorpos da invenção e, opcionalmente, para co-administrar agentes anti-neoplásicos e/ou de outros antagonistas dos receptor. O agente anti-neoplásico regimes utilizado, de acordo com a invenção, incluem qualquer regime que se pensa ser melhor adequado para o tratamento da condição do paciente neoplásica. Diferentes malignas podem exigir uso de antitumor anticorpos específicos e de anticorpos específicos agentes anti-neoplásica, que será determinado em função de um paciente para paciente. As vias de administração incluem, por exemplo, por via oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular. A dose administrada depende do antagonista de vários fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de antagonistas, o tipo e gravidade tumoral a ser tratado e da via de administração dos antagonistas. Deve-se enfatizar, no entanto, que a presente invenção não se limita a um método específico ou à via de administração.

Alguém versado na técnica entenderia que as doses e a frequência do tratamento dependerá da tolerância do paciente individual e sobre os farmacológicos e farmacocinéticos porperties de bloqueio ou inibitória agente utilizado. Idealmente, uma vontade de alcançar saturável farmacocinética para o agente utilizado. A dose para ambos os anti-IGF-IR e anti-PDGFR α Anticorpos pode variar, por exemplo, de cerca de 10 para cerca de 1000 mg de V/m², de preferência a partir de cerca de 200 para cerca de 400 mg de V/m². Isto pode ser seguido por vários outros diários ou semanais dosagens variando, por exemplo, de cerca de 200 para cerca de 400 mg de V/m². O paciente é monitorado por efeitos secundários e o tratamento é interrompido quando tais efeitos colaterais são graves.

Alguém versado na técnica também é necessário saber como acompanhar a evolução do tratamento, a fim de determinar uma dose eficaz. Para as metástases ósseas de câncer de próstata, uma tal maneira é acompanhar níveis de PSA. Outras maneiras de acompanhar as metástases ósseas incluem varreduras óssea e IRM.

Para os pacientes para os quais o tratamento de câncer induziu perda óssea (CTIBL) é um risco ou problemático (por exemplo, os pacientes que recebem terapia adjuvante hormônios para o câncer da mama ou privação androgênio-terapia para câncer de próstata), qualquer tratamento supracitado pode ser completado pela administração dos agentes de prevenção de CTEBL, tais como bifosfonatos. Bisfosfonatos incluem, por exemplo, clodronato, risedronato, e ácido zoledrônico.

Ao longo de todo este pedido, publicações diversas, textos de referência, livros, manuais técnicos, patentes, patentes e pedidos foram referidos. Os ensinamentos e divulgações dessas publicações, patentes, pedidos de patentes e outros documentos em seus integridades são incorporadas por referência a esse pedido para mais plenamente descrever

o estado da técnica para a qual o presente invento pertence.

Deve ser compreendido e esperado que as variações nos princípios da invenção aqui divulgados podem ser feitos por alguém versado na técnica e pretende-se que essas modificações devam ser incluídas no âmbito da presente invenção.

5 Os seguintes exemplos ilustram melhor a invenção, mas não devem ser interpretados de forma a limitar o âmbito da invenção de forma alguma. As descrições detalhadas dos métodos convencionais, tais como as pessoas que trabalham na construção de vetores e plasmídeos, e expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpos podem ser obtidos a partir de diversas publicações, incluindo Sambrook, J *et al.*, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Coligan, J. *et al.* (1994) Current Protocols em Imunologia, Wiley & Sons, Incorporated; Enna, SJ. *Al ET.* (1991) Current Protocols em Farmacologia, Wiley & Sons, Bonifacino, JS *Al ET.* (1999) Current Protocols em Cell Biology, Wiley & Sons. As referências aqui mencionados são incorporadas na íntegra.

15 Exemplos

Exemplo 1

Efeitos do IMC-A12 e docetaxel sobre o crescimento tumoral.

Pedaços de tumores (20 a 30 mm³), de LuCaP 35V androgênio-independentes (AI) foram implantados por via subcutânea (sc) em camundongos SCID castrados com 32 seis
20 semanas de idade respectivamente como descrito anteriormente (4). Quando a implantação tumoral foi observada para atingir um volume de 150-200 mm³, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de estudos de tratamento. Os animais do grupo 1 receberam tratamento com docetaxel na dose de 20 mg/Kg. Os animais do Grupo 2 receberam tratamento com docetaxel em uma dose de 10 mg/kg. Os animais do Grupo 3 receberam tratamento combinado de 10 mg/kg docetaxel e 40 mg/Kg A12. Os animais do Grupo 4
25 receberam tratamento combinado de 20 mg/kg docetaxel e 40 mg/Kg A12. Todos os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (IP). O docetaxel foi administrado uma vez por semana. A12 foi administrado três vezes por semana. Todos os animais foram tratados durante quatro semanas e monitorados por quatro semanas suplementares antes do
30 sacrifício. Os tumores foram medidos duas vezes por semana e volume tumoral foi calculado pela fórmula: Volume = L x P²/2. Seguindo o nosso protocolo de animais da Universidade de Washington aprovado pelo IACUC, alguns animais foram sacrificados uma hora mais cedo, quando o tumor atingiu um volume de 1000 mm³ ou quando a perda de peso corporal dos animais ultrapassou 20% de peso inicial corporal. Os animais foram pesados duas vezes por semana. Amostras de sangue foram coletadas do seio orbital semanalmente. Soro
35 foi separado e o nível de PSA foi determinado utilizando o Ensaio EVI_x Total PSA (Abott Laboratories, Abott Park, IL). BrdU foi injetado no tumores 1 hora antes de os animais serem

sacrificados para avaliação da taxa de proliferação de células tumorais in vivo.

Após o sacrifício, os tumores foram recolhidos e reduzidos à metade. Uma parte dos tumores foi fixada em tampão neutro de formalina 10% (NFB), e incorporados em parafina. Seções de cinco microns foram preparadas para coloração imuno-histoquímica (IHC). A parte restante do tumor foi dividida mecanicamente em células únicas pela trituração e filtradas através de peneiras de Nylon de 70 μm .

Conforme mostrado na figura. 1, enxertos LuCaP 35V cresceram agressivamente em camundongos com uma taxa média de crescimento de $362,0 \pm 72,0 \text{ mm}^3/\text{semana}$ sem qualquer tratamento. Todos os animais do grupo não-tratados tiveram de ser sacrificados no prazo de três semanas após o início do tratamento em grupos experimentais, devido a tumores com volumes que excedem 1000 mm^3 . Quando os animais foram tratados com 40 $\mu\text{g/kg}$ de A12 isoladamente, o crescimento tumoral foi reduzido para $192,7 \pm 35,6 \text{ mm}^3/\text{semana}$ durante o tratamento. Quando docetaxel foi administrado aos animais em uma dose de 10 mg/kg , a taxa de crescimento de tumor LuCaP 35V foi reduzida para uma média de $29,6 \pm 6,1 \text{ mm}^3/\text{semana}$. Quando docetaxel foi administrado em combinação com tratamento A12, a taxa de crescimento de tumor LuCaP 35V foi ainda reduzida a uma média de $7,9 \pm 1,0 \text{ mm}^3/\text{semana}$ (Fig. 1b). O efeito inibitório do docetaxel combinado com A12 persistiu por mais de quatro semanas após o fim do tratamento. Quando uma maior dose de docetaxel (20 mg/kg), foi dado aos animais, independentemente, com ou sem combinado tratamento A12, volume tumoral não aumentou durante o período de tratamento de quatro semanas; em contrapartida, uma tendência de redução do volume tumoral foi observada. Porém, nas quatro semanas seguintes ao fim do tratamento, a redução do volume tumoral foi mantida no grupo de animais tratados com docetaxel combinado com A12. Em contraste, volumes tumorais foram aumentando a uma taxa média de $27,0 \pm 16,1 \text{ mm}^3/\text{semana}$ no grupo de animais tratados com docetaxel em monoterapia. Estes resultados têm sugerido que, em uma determinada dose de docetaxel, o tratamento combinado com A12 pode aumentar o efeito inibitório do docetaxel sobre o crescimento tumoral durante o tratamento ou após o tratamento Acompanhamento.

PSA é um parâmetro clínico comumente utilizado para avaliar o crescimento tumoral próstata. Serum PSA níveis foram medidos em animais durante e após o tratamento. Conforme mostrado na figura. 1c, nos animais tratados com A12 e docetaxel ou 20 mg/kg apenas docetaxel, nenhuma mudança significativa foi observada nos níveis séricos de PSA durante as quatro semanas de tratamento, compatível com o crescimento tumoral reprimido. Após o fim do tratamento, os níveis séricos de PSA foram demonstrados aumentados em animais tratados apenas com docetaxel e, em contrapartida, coerentes ou mesmo diminuídos em animais tratados com docetaxel em associação com a A12. Estes dados são consistentes com a continuação do tratamento pós-inibição do crescimento tumoral em animais trata-

dos com docetaxel e A12.

Indução da apoptose por docetaxel combinado com anticorpo anti-IGF-IRs

O efeito *in vivo* combinado do docetaxel e A12 tratamento no ciclo celular e sobrevivência de célula nos pontos finais experimentais foi medido por ensaio de marcação da extremidade nick mediada por desoxinucleotidil transferase (TUNEL) e marcação com propídio (PI) utilizando o Apop-Diret Kit (BioScience BD), como descrito anteriormente. Resumidamente, 1×10^6 células de suspensão de única célula foram fixadas com tampão formalina neutro 10% (NBF), seguidos por 70% de etanol em álcool 20 °C por 30 minutos. Após várias lavagens, as células foram permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 e incubadas com conjugado FITC-dUTP e enzima terminal desoxinucleotidil tranferase (TdT) a 37°C durante 1 hora, a que se seguiu uma incubação com PI/RNase tampão (100 μ g/mL de PI, 50 μ g/mL de RNase) à temperatura ambiente durante 60 minutos. As amostras foram analisadas pelo fluxo citometria usando uma BD FACscan. Os dados foram analisados com CellQuest^{PRO} softwares.

Quatro semanas após o fim do tratamento, apoptose foi detectada em uma percentagem significativa dos tumores de animais que tinham sido tratados com docetaxel (66,7% em grupo tratado com Docetaxel 10 mg/Kg e 77,8% em grupo tratado com Docetaxel 20mg/kg), em combinação com a A12 (Fig. 2b e Tabela 1), independentemente da dose de docetaxel sendo usada. A média de eventos apoptóticos nestes tumores ocorreu a uma taxa de $15,0 \pm 4,3\%$. Nenhuma apoptose em tumores foi detectada em animais que foram tratados apenas com docetaxel. Em vez disso, a maioria (88% em grupo tratado com Docetaxel 10 mg/Kg e 100% em grupo tratado com Docetaxel 20mg/kg) dos tumores procedeu ao normal ciclo celular (Fig. 2a e Tabela 3).

Tabela 3 – Ciclo celular tumoral e atividades de sobrevivência no momento do sacrifício

Tratamento	Apoptose (%)	Aprisionamento G1 (%)	Aprisionamento G2 (%)	Ciclo normal (%)
Nenhum	0	0	0	100
Doc (20)	0	0	0	100
Doc (20) $\pm$ A12	66.7	33.3	0	0
Doc (10)	0	0	12	88
Doc (10)+A12	77.8	0	0	12.2

Para avaliar ainda mais a capacidade de proliferação de células tumorais após um final de tratamento diferente, secção em parafina de anticorpos anti-BrDu corados. Amostras tumorais foram fixadas em 10% NBF, embebidas em parafina, e seccionadas em 5- μ milhões em lâminas. Após retirada da parafina e reidratação, antígenos foram recuperados com 0,01

M ácido cítrico (pH 6,0) a 95°C durante 2 X 5 minutos. As lâminas foram autorizados a arrefecer durante 30 minutos, seguida por lavagem seqüencial com PBS. A atividade de peroxidase endógena foi interrompida por uma incubação com 0,3% de H₂O₂ em metanol durante 15 minutos. Após o bloqueio com soro de cabra normal 1,5% em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) durante 1 hora, lâminas foram incubadas com o camundongo medidas anti-BrdU anticorpo (1 μ g/mL) por 1 horas seguidas de incubação seqüencial com biotina cabra IgG anti-camundongo de 30 minutos, peroxidase -rotulada avidin durante 30 minutos (Santa Cruz Biotechnology) e diaminobenzidina (DAB)/substrato peróxido de hidrogênio cromogênio (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 5-10 minutos. As etapas de incubação foram realizadas em temperatura ambiente. As lâminas foram cotra-marcadas com hematoxilina (Sigma), e montadas com permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey). Para controle negativo, IgG de camundongo (Vector Laboratories), foi utilizada em vez de anticorpo anti-BrdU primário. As lâminas foram examinadas no âmbito de um Microscópio Zeiss e imagens digitais foram obtidas. Números de BrdU-rotulada núcleo núcleo e total foram coletados de 10 aleatória opiniões de cada seção. O índice de proliferação foi calculado pelo número de núcleos BrdU-positivos dividido pelo número total de núcleos. Dez campos foram contadas por deslize. A marcação H & E foi realizada usando hematoxilina e eosina (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

Nos animais que foram tratados com docetaxel e A12, a captação de BrDu foi significativamente menor do que os tratados com a mesma dose de docetaxel em monoterapia (Fig. 3). Esses dados de incorporação de BrDu são coerentes com as observações acima do ciclo celular e apoptose, sugerindo que A12 significativamente reforce a citotoxicidade de docetaxel.

Regulação diferencial da expressão do gene em tumores tratados com docetaxel combinado com anticorpo anti-IGF-IRs versus apenas docetaxel

Para determinar os mecanismos potenciais para o efeito do docetaxel nitidamente reforçada pela A12, IGF-IR expressão foi analisada em todas colhidas tumores por análise imunológica e fluxo citometria. Não houve diferença na superfície IGF-IR expressão entre todos os grupos de tratamento ou, em comparação com o grupo controle (dados não apresentados). Pós-tratamento expressão genética foi analisado utilizando cDNA microarray análises em tumores de animais que tinham receberam 20 mg/kg de docetaxel e 20 mg/Kg de docetaxel combinado com A12. Baseado em análise SAM, 49 genes foram identificados como diferentemente expressos em tumores que receberam o tratamento combinado de docetaxel e A12, em comparação com aqueles recebeu apenas docetaxel, com mais de 2 vezes mudança e menos de 10% falsa descoberta taxa (FDR) (dados não Mostrada). Treze genes foram identificados que são potencialmente envolvidos na regulação do ciclo celular ou apoptose (Tabela 4). Todos os 13 genes foram, pelo menos, 2 vezes diferentes entre os

dois tratamentos e tinha um FDR com menos de 0,02%. Nove genes estabelece-se regulamentado e quatro foram até genes-regulamentado em tumores tratados com docetaxel e A12, em comparação com tumores tratados com docetaxel em monoterapia.

5 Tabela 4 - Expressão genética diferenciada pós-tratamento em tumores tratados com docetaxel + A12, em comparação com tumores tratados com docetaxel em monoterapia.

HUGO	Nome	Função GO	Fold change	FDR
Genes infra-regulados				
CDC2	Ciclo 2 de divisão celular	citoquinase; mitose;	3,0	$\leq 0,02\%$
CDC6	Homólogo de ciclo 6 de divisão celular de CDC6	regulação negativa da proliferação celular	2,2	$\leq 0,02\%$
CCNA2	Ciclina A2	regulação da atividade de CDK	2,1	$\leq 0,02\%$
MYBL2	Homólogo de oncogênese viral de Mioblastose V-myb (aviária) tipo 2	Anti-apoptose; desenvolvimento; regulação do ciclo celular;	3,2	$\leq 0,02\%$
TUBB	Tubulina beta onipresente	movimento baseado em microtúbulo resistência a taxano	2,3	$\leq 0,02\%$
K-ALFA-1	Tubulina alfa onipresente	movimento baseado em microtúbulo resistência a taxano	2,5	$\leq 0,02\%$
BIRC5	IAP Baculoviral contendo repetição 5 (survivina)	anti-apoptose	2,5	$\leq 0,02\%$
CDC25B	Ciclo 25B da divisão celular	regulação positiva da proliferação celular	2,0	$\leq 0,02\%$
MYC	Homólogo de oncogênese viral de Mioblastose V-myb (aviária)	ciclo de aprisionamento celular	2,5	$\leq 0,02\%$
Genes supra-regulados				
TOB1	Tradutor de ERBB21	regulação negativa	2,2	$\leq 0,02\%$

		da proliferação celular		
CCNG2	Ciclina G2	Ponto de checagem de ciclo celular	2,1	±0,02%
IGFBP3	Fator de crescimento similar à insulina ligado à proteína 3	regulação de crescimento celular, pró-apoptótico	2,0	±0,02%
BIRC3	IAP Baculoviral contendo repetição 3	Anti-apoptose; tradução de sinal ligado ao receptor de superfície celular	2,2	±0,02%

Para genes selecionados, os resultados foram confirmados pelo RT-PCR de tempo real. Um fragmento padrão de PCR de DNAc alvo foi purificado. Uma série de diluições padrão de 10 ng/ μ L a 10⁻³ pg/ μ L de foram utilizados para RT-PCR de tempo real para gerar curvas padrão. Um μ g de RNA total de cada grupo de tumor agrupado foi utilizado para síntese de DNAc de primeira fita usando Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen). RT-PCR de tempo real foi realizada em 20 μ l de mistura de reação contendo 1 μ l de DNAc de primeira fita, conjuntos de iniciadores específicos, e Lightcycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green usando um Roche Lightcycler seguindo o protocolo do fabricante (Roche, Nutley, NJ). Os produtos de RT-PCR foram submetidos a fusão curva análise utilizando o programa Lightcycler v3.5. Os tamanhos de amplicons foram confirmados por eletroforese em gel de agarose. Cada amostra foi doseada em dobro. Os resultados são apresentados na Fig. 4.

Dos genes infra-regulados, TUBB foi mostrado para resultar em resistência ao docetaxel (Tanaka *et al.* De 2004, Int. J. Cancer 111, 617-26), e o aumento da expressão de BIRC 5 (survivina) tem demonstrado ser associado com câncer de próstata agressivo e resistência à terapia antiandrogênica (de Angelis *et al.* De 2004, Int. J. Oncol. 24, 1279-88; Zhang *et al.* De 2005, Oncogene 24, 2474-82) Além disso, TUBB é um gene regulamentado por IGF-IR que está envolvido com a transformação mediada por IGF-IR (Loughran *et al.* De 2005, Oncogene 24, 6185-93). Dos quatro genes supra-regulados, IGFBP3 foi demonstrado por inibir a sinalização de ligante-IGF, bem como por induzir apoptose nas células tumorais de próstata em um ligante de forma dependente (Grimberg *et al.* De 2000, J. Cell. Physiol. 183, 1-9).

Níveis séricos pós-tratamento de A12

Os níveis séricos de A12 foram medidos em animais que receberam docetaxel havia combinado com a A12. Os níveis séricos de A12 diminuíram 100 vezes duas semanas

após a interrupção do tratamento, e foram detectados a um nível muito baixo quatro semanas após a interrupção do tratamento (Fig. 5).

Citotoxicidade Geral

A citotoxicidade da co-administração de docetaxel e IMC-A12 foi examinada. Embora A12 tenha reatividade cruzada superior a 95% com murino IGF-IR, nenhuma atividade ou comportamento anormal diário de mudanças foi observado em animais tratados com docetaxel isoladamente ou reagentes combinados, em comparação com o animais portadores de tumores controle. Nenhum efeito significativo sobre células renais foi observado em qualquer grupo de tratamento tanto por ensaios de ciclo celular como apoptose (dados não apresentados). Nenhuma alteração significativa do peso corporal foi observada entre os grupos de tratamento (Fig. 6).

Terapia com anticorpo anti-IGF-IR para metástase óssea

A eficácia do tratamento com anticorpo anti-IGF-IR sobre o crescimento metastática do câncer da próstata em células ósseas foi avaliada usando células de próstata injetada diretamente na tíbia de camundongos SCID. Por este método, tumores metastáticos são estabelecidas diretamente, sem dependência de quimiotaxia dependentes de invasão da circulação. Uma variedade de linhagens tumorais está disponível para estabelecer as metástases ósseas. Estes incluem células PC-3, LuCaP35, e LnCaP que produzem lesões osteolíticas e células LuCaP 23.1 que produzem lesões osteoblásticas.

Células LuCaP 23.1, que expressam IGF-IR, tem um índice de -80% no ambiente ósseo e resultam em reações osteoblásticas, em experimentos preliminares, amostras LuCaP 23.1 apresentavam um aumento significativo na quantidade vs tecido ósseo de volume (BV%/TV) em tumoral versus tíbias controle (254-503% de controle; $p = 0,024$). As LuCaP 23.1 tumores em tíbias exibiu nova ósseas trabeculae, que não estiveram presentes nas amostras normais, e um elevado número de focos tumorais, que tinha substituído o normal medula óssea. Em alguns espécimes o crescimento tumoral e osso foram prorrogado o original osso. Aumentou% BV/TV de LuCaP 23.1 amostras também foi observado após a castração; o% BV/TV de tíbias o tumor foi 212-354% do que a de tíbias sem o tumor ($p = 0,024$). Os resultados observados para o comércio intra-tíbia enxertos de LuCaP 23.1 indicam a existência de nova formação óssea estimulada por células tumorais. Além disso, os tumores apresentam muitas semelhanças com amostras humanas de metástases ósseas osteoblásticas, incluindo um grande número de focos tumorais e aumento da quantidade de osso mineralizado.

Para avaliar a eficácia do tratamento com o IMC-A12, enxertos de tumores LuCaP 23.1 foram enxertados em camundongos SCID, e níveis séricos de PSA foram medidos bi-weekly para avaliar o crescimento tumoral.. Todos os animais foram castrados duas semanas antes da tíbia enxerto de células tumorais. Administração de EVIC-A12 para testar ca-

mundongos foi iniciada quando níveis séricos de PSA atingiu 5-10 ng/mL (indicando tumores estabelecidos). 40 mg/Kg IMC-A12 foi injetado ip três vezes por semana durante seis semanas.

A densidade mineral óssea (DMO) da tíbias com tumores e tíbias contralaterais sem tumor foi medida por absorciometria dupla de raios-X (PIXImus Lunar densitometer) realizada em uma área de 2,5 mm x 2,5 mm na célula tumoral injeção, ou o local correspondente de O contra-tíbia no momento do enxerto. A avaliação a cada duas semanas das lesões foi feita pelas medições de soro PSA. Todos os animais foram sacrificados quando as lesões ósseas no grupo de controle tinha recorreram após castração baseada em níveis séricos de PSA (LuCaP 35 >60 ng/mL, ng/mL, LuCaP 23.1 >500 ng/mL), aparência radiográfica das lesões ósseas ou quando os animais se tornaram comprometidos. Uma hora antes de serem sacrificados, os animais foram injetados com BrdU para controlar a proliferação de células tumorais. As radiografias foram tomadas antes do sacrifício (FaxitronX raios-MX-20), e de ambas as tíbias DMO foram medidos no momento do sacrifício.

Tabela 5 – Densidade Mineral Óssea (DMO)

Tratamento	A12		Controle	
	Perna com tumor	Perna sem tumor	Perna com tumor	Perna sem tumor
Média	0,060	0,045	0,098	0,053
Valor P comparado ao tumor controle	0,0057			
Valor P comparado à perna sem o tumor	0,0004		0,0049	

Os níveis de PSA sérico foram significativamente mais baixos em camundongos tratados com IMC-A12 (Fig. 7), e ao aumento da DMO associados com o crescimento de tumores metastáticos osteoblásticas foi significativamente reduzida, bem (Tabela 5). As medições de DMO da pernas sem tumor indicou que tratamento com IMC-A12 não provocou uma perda de densidade óssea (osteoporose). Radiografias do IMC-A12-tratadas e não tratadas camundongos mostram que a progressão tumoral foi significativamente reduzida ou impedida em camundongos tratados (Fig. 8).

Combinação de anticorpo anti-IGF-IRs e docetaxel para metástases ósseas. camundongos SCID são castrados 2 semanas antes da tíbia tumoral injetáveis. Metástases ósseas são gerados por injeção direta de células de câncer de próstata LuCaP 23.1 na tíbia dos camundongos, dando origem a lesões osteoblásticas. O enxertos expressam IGF-IR.

Níveis séricos de PSA são medidos a cada duas semanas para avaliar o crescimento tumoral. Quando níveis séricos de PSA chegam a 5-10 ng/mL indicando estabelecido tumoral, os animais são distribuídos aleatoriamente em quatro grupos.

Em dois grupos, 40 mg/kg de BVIC-A12 são injetados IP Três vezes por semana durante seis semanas com um grupo recebendo IMC-A12 + Docetaxel 20 mg/Kg IP, uma vez por semana durante 6 semanas e um segundo grupo, o IMC-A12 + Docetaxel 10 mg de IP Três vezes por semana durante 6 semanas. Controle grupos recebem 0 ou 20 mg de docetaxel IP Sem IMC-A12.

Animais são monitorados semanalmente com medições de PSA. Após o fim do tratamento, os animais continuam a ser monitorados semanalmente com medições de PSA até que os tumores em grupos de apenas docetaxel mostrem ressurgimento tumoral. Como aumento de valores de PSA de grupos de apenas docetaxel (embora a um ritmo mais lento que em animais não tratados), níveis de PSA em camundongos tratados com IMC-A12 + docetaxel se nivelam e, em alguns animais, começam a decrescer. As reduções nos níveis de PSA são observadas por continuar, mesmo após o encerramento do tratamento em seis semanas.

Como indicado acima, as medições de DMO são feitas no momento do enxerto e no sacrifício, e radiografias são tomadas apenas antes do sacrifício. Os grupos tratados com IMC-A12 + docetaxel- mostram pouco ou nenhum aumento na DMO, e radiografias mostram pouco ou nenhum sinal de atividade osteoblástica.

Combinação de anticorpo anti-IGF-IRs e docetaxel para metástases ósseas

Pedaços de tumor de próstata LuCaP 23.1 humano (20 a 30 mm³) foram mecanicamente digeridos. 2.5×10^5 de células viáveis LuCaP 23.1 foram injetadas nas tíbias de camundongos SCID com 6-8 semanas de idade. 21 camundongos distribuídos aleatoriamente em três grupos foram usados para o estudo. Após a injeção tumoral, soro PSA foi monitorizada semanalmente. O tratamento começou quando nível sérico de PSA alcançado 5-10 ng/mL, uma indicação de crescimento tumoral. Grupo 1 recebeu veículo de salina tampão controle. Grupo 2 recebeu 20 mg/Kg de docetaxel IP, uma vez por semana durante 4 semanas. Grupo 3 recebeu 20mg/kg de docetaxel, uma vez por semana e 40mg/kg de A12 IP Três vezes por semana durante 4 semanas. Para determinar se a resposta ao tratamento foi osteoblástica ou osteolítica, DMO foi medido por DEXA-scan e raios X dos animais no ponto final de todos os tratamentos.

Apenas docetaxel ou docetaxel combinado com A12 significativamente inibiu crescimento tumoral LuCaP 23.1 como refletido pela supressão dos níveis séricos de PSA (Fig. 9), sem diferença significativa entre os dois tratamentos. No entanto, após a interrupção do tratamento, os níveis séricos de PSA começaram a aumentar nos animais que tinham sido tratados com docetaxel em monoterapia, indicando um re-crescimento das tumoral; que

continuou supressão dos níveis séricos de PSA foram observados nos animais que receberam o tratamento combinado, o que indica um período prolongado De pós-tratamento tumoral quiescence. Níveis séricos de PSA foram mostrados para correlacionar com a densidade óssea (DMO) e radiografados os tamanhos de ossos tumorais (Fig. 9b). Na semana cinco, a
 5 média densidade óssea no controle, o docetaxel 20, e docetaxel 20 combinado com animais tratados A12 foi $0,112 \pm 0,01$, $0,09 \pm 0,02$, e $0,05 \pm 0,009$ (média $\pm$ SEM), respectivamente. Houve uma aparente tendência para uma diminuição na densidade óssea com o tratamento.

Exemplo 2

Fosforilação de Akt induzida por aspirado de medula óssea

10 Amostras de medula óssea de doadores normais masculinos (idades 18-45), foram fornecidas por Cambrex (Poietics™ Donor Program). As amostras foram centrifugadas em 1500 RPM, de modo a separar as fases solúveis e celulares. O sobrenadante foi filtrado utilizando $0,8 \mu\text{m}$ E $0,22 \mu\text{m}$ filtros em sucessão. $50 \mu\text{g/mL}$ de aspirado de medula óssea foi administrado a células em 1 mL de meio (1: 20 diluição final).

15 Para experimentos realizados na presença de soro, as células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% FBS e $50 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina durante 24 horas antes da exposição a medula óssea. Para experimentos na ausência de soro (starved células), as células foram lavadas duas vezes com PBS, o crescimento médio foi substituído com soro-livre DMEM, e as células foram incubadas por 4 horas antes da exposição ao preparado de
 20 medula óssea. Quando utilizado, AG-1296, um inibidor específico da PDGF receptor (Rice *et al.*, 1999, Amer. J. Path. 155, 213-21) foi adicionado ao culturas 30 minutos. Antes da exposição ao osso marrowaspirate. IMC-3G3 anticorpos foram administradas conforme descrito no pré-tratamento vezes como indicado abaixo.

Ativação dw Akt por medula óssea foi detectada em células PC3-ML, que expres-
 25 sam PDGFR α , mas não em células DU-145, o que falta a receptor. Em um experimento, para minimizar o efeito de componentes de soro em ativação de Akt de células foram preincubadas durante 4 horas em meio livre de soro. A adição de extratos da medula óssea resultou em fosforilação robusta de Akt nas células PC3-ML, mas não células DU-145. (Fig. 10A). Para avaliar o significado da resposta, um segundo experimento foi realizado com so-
 30 ro. Uma estimulação robusta da fosforilação de Akt no PC3-ML por células da aspirado de medula óssea também foi observado na presença de soro. (Fig. 10B). Apenas uma pequena resposta foi suscitada em células DU-145.

Fosforilação de Akt mediada por PDGFR α .

Imagina-se que osteoblastos e osteoclastos, que secretam tanto PDGF-AA e
 35 PDGF-BB, proporcionam o crescimento destes fatores solúveis no meio de medula óssea. Para determinar se a resposta do células PC3-ML de medula óssea extractos foi relacionada com a tradução de sinal através PDGFR α , células PC3-ML foram expostas a aspirado de

medula óssea a ausência ou presença de 20 μ M AG-1296. Esta concentração de AG-1296 inibe totalmente ativação de Akt. induzida por PDGF-BB (Fig. 1 IA) AG-1296 inibiu a ativação de Akt induzida por aspirado de medula óssea por mais de 40%. (Fig. 1 IB e D). Isto indica que a sinalização de PDGFR α é responsável por uma proporção significativa da ativação de Akt induzida pela medula óssea.

A contribuição direta de PDGF-AA e BB-para PDGFR α sinalização em relação a outros componentes da medula óssea aspirates também foi avaliada. Foi decidido que as concentrações de PDGF-AA e BB-na medula óssea aspirates provenientes de três diferentes doadores variou de 400 pg/mL a 2 ng/mL. Dada a diluição de 20 vezes do aspirado de medula, células teste estavam realmente sendo expostas a PDGF-AA e BB em concentrações entre 20 e 100 pg/mL de. Assim sendo, células PC3-ML foram tratados com 100 pg/mL de cada uma das PDGF-AA e BB-. fosforilação de Akt foi inferior a 10% do que o obtido com a medula óssea aspirates. Fig. 3 C e D). Assim sendo, parece que a ativação da Akt através de sinalização de PDGFR α pode envolver ligantes PDGFR α s com exceção de PDGF-AA e BB-e/ou outros mecanismos de ativação de PDGFR α por ligação direta de um ligante.

Inibição da fosforilação de Akt por um anticorpo anti-PDGFR α .

O anticorpo neutralizante IMC-3G3, que é específico para humanos PDGFR α também foi testado na sua capacidade de inibir a fosforilação da Akt no células PC3-ML. A pré-incubação tempo de 30 minutos e uma concentração de 20 μ g/mL de simuladora neutralizados os efeitos de 30 ng/mL de PDGF-BB. (Fig. 12A) O tratamento com o anticorpo também resultou em cerca de 40% de inibição da fosforilação de Akt induzida por medula óssea (Fig. 12B e C). Também foi observado que o efeito inibitório do IMC-3G3 sobre fosforilação de Akt foi dependente da duração do preincubation, com 120 minutos de incubação tempo a ser significativamente mais eficaz (Fig. 12D) do que os 30 minutos de incubação tempo (Fig. 12 B, C). Uma explicação possível é que o IMC-3G3 induz a internalização dos PDGFR α , e que o seu efeito inibitório está relacionado não só com bloqueio de ligação ao ligante, mas também para a remoção do receptor da membrana plasmática.

Exemplo 3

Isolamento de Antibodies Anti-PDGFR α Humanos

Anticorpos monoclonais anti-PDGFR α humanos foram gerados por uma tecnologia padrão de hibridomas (Harlow & Lane, edição., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que está incorporada neste documento por referência), utilizando camundongos transgênicos (Medarex Inc., Sunnyvale, CA), que expressam humanos gama pesados e leves kapa imunoglobulina cadeias. Domínio extracelular humano PDGFR α (ECD), foi adquirido de R & D Systems (Minneapolis, MN). Camundongos KM foram imunizados por via subcutânea (sc), com 3×10^7 células aórticas suínas endoteliais expressando estavelmente PDGFR α (PAE Ra). Após 4 semanas, os camundongos foram

injetados sc Com 50 μ g de PDGFR α ECD em adjuvante completo de Freund mais 3×10^7 de células PAE Ra determinado IP os camundongos foram injetados mais duas vezes, 3 semanas distante, com 25 μ gramas PDGFR α ECD em adjuvante incompleto de Freund.

Esplenócitos de camundongos com elevados níveis séricos a ligação e bloqueando titers foram isolados e fundidos com mieloma células. As culturas de hibridomas exibindo bloqueio atividade foram subclonadas e anticorpos destes hibridomas foram purificados por cromatografia de proteína G.

IgGs foram avaliados para a ligação a PDGFR α em um ensaio de ligação direta. PDGFR α ECD em PBS foi imobilizado em uma placa de 96 poços (100 ng/poço). Placas foram então lavadas com PBST (PBS + 0,05% Tween 20) e bloqueadas com PBSM (3% leite em PBS, 200 μ L/cavidade) por 2 horas a 25 °C. IgGs diluído em PBSM foram incubadas com o PDGFR α ECD imobilizado de 1 h às 25 °C, e as placas foram lavadas com PBST. Um anticorpo secundário (conjugado de F(aB')₂ IgG antihumana de cabra-peroxidase de rábano; BioSource International, Camarillo, CA) diluído 1:5000, em PBSM foi introduzido durante 1 hora a 25°C. Após as placas foram lavadas com PBST, um substrato TMB peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD) foi adicionado e a reação foi interrompida com 100 μ L de 1 mol/L H₂SO₄. As placas foram lidas em A450 executado usando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

O bloqueio de PDGF foi avaliada utilizando um ensaio de fase sólida de bloqueio de PDGF (ver Duan et al.-1991, J. Biol. Chem. 266:413-8, que será incorporada por referência). PDGFR α ECD foi diluída em PBS e revestidos, em 96 poços microtiter placas (Immulon 2HB de fundo plano 1 x 12 Removawell tiras de irradiados ligação às proteínas poliestireno; Dynex Technologies, Chantilly, VA). Cada poço foi revestido com 60 ng PDGFR α durante 3 horas a 25°C em um volume total de 100 μ L. Placas foram então lavadas duas vezes e bloqueadas durante a noite a 4 °C com 25 mmol/L HEPES (pH 7.45), 0,5% gelatina, 100 mmol/L NaCl, e 0,1% Tween 20. Placas foram então aquecido a 25°C durante 20 minutos e depois lavados com carácter a ligação tampão (25 mmol/L HEPES (pH 7.45), 0,3% gelatina, 100 mmol/L NaCl, 0,01% Tween 20). Cinquenta microlitros de IgGs foram adicionados a cada poço e incubados a 25°C por 30 minutos. Iodinated PDGF foi diluído em tampão a ligação e acrescentou (50 μ L de um 1 nmol/L solução), a cada poço. Placas foram incubadas durante 2 horas a 25°C e em seguida lavadas cinco vezes com tampão a ligação. Cada poço foi contado em um contador gama. O ensaio de bloqueio baseado em célula foi feito conforme descrito em Heldin et al., 1988, EMBO J. 7, 1387-93.

A cinética de ligação a anticorpos para PDGFR α foi medido utilizando um BIAcore 3000 instrumento (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). PDGFR α ECD foi imobilizado em um chip sensor e o anticorpo foi injetado em diversas concentrações. Sensograms foram obtidos em cada concentração e avaliada usando o programa BIA Evaluation 2.0 para determinar as

constantes de taxa. A afinidade constante, K_d , foi calculada a partir da razão das constantes de taxa K_{off}/K_{on} .

A Fig. 13 mostra a ligação dose-dependente do anticorpo monoclonal humano DVIC-3G3 para PDGFR α ECD imobilizadas em ELISA. A concentração de anticorpo exigida para 50% no máximo de ligação para PDGFR α ECD foi 0,06 nmol/L (Tabela 6). O ED50 é coerente com a K_d para o anticorpo como determinado pela ressonância de superfície de plasmon em um instrumento BIAcore (Tabela 1). O anticorpo monoclonal também bloqueia [^{125} I] PDGF-BB a ligação para receptor imobilizado, com um IC50 de 0,43 nmol/L. Os locais de ligação para PDGF-PDGF-AA e BB em PDGFR α estruturalmente não são coincidentes. Os dados sugerem que o epítipo para 3G3 sobrepõem espacialmente ambos os locais de ligação a fator de crescimento.

Tabela 6 - características de ligação de anticorpo anti-PDGFR α

Ligação a PDGFR α	Bloqueio de PDGF		Cinética de ligação		
(ED ₅₀ , nmol/L)	Fase sólida (IC ₅₀ , nmol/L)	Baseado em célula (IC ₅₀ , nmol/L)	K_{on} (10^5 mol/L ⁻¹ s ⁻¹)	K_{off} (10^4 s ⁻¹)	K_d (10^9 mol/L)
0,06	0,24	0,58	11,50	0,47	0,04

Inibição da ativação e fosforilação do receptor de moléculas efetoras abaixo.

Os efeitos sobre a sinalização intracelular induzidas por PDGF pelo IMC-3G3 foram determinados utilizando células PAE Ra. As células foram semeadas em placas Falcon de cultura de tecido de seis poços (250.000 células por poço), e deixadas a crescer durante a noite. Os poços foram lavados e, em seguida, incubados em meio livre de soro. Após uma noite de incubação para tornar as células quiescentes, as células foram tratadas com anticorpos durante 30 minutos a 37°C seguido de adição de PDGF-AA ou PDGF-BB e incubação, por um período adicional 10 minutos a 37°C. As células foram então separadas e lysed em 200 μ L lise (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0), Triton X-100 1%, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, SDS 0,1%, 1 mmol/L de ortovanadato de sódio, e os inibidores de protease (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemanha)). Os lisados celulares foram analisados por SDS-PAGE e Western blot usando reagentes de quimioluminescência reforçada e Hyperfilm (Amersham Biosciences).

O anticorpo foi testado para a capacidade de inibir fosforilação de receptor de tirosina induzida por ligante. PDGF-AA e PDGF-BB aumentam fosforilação de tirosina PDGFR α em cerca de 5 vezes em concentrações de 1 e 3 nmol/L, respectivamente. Concentrações mais altas de ligante (10 nmol/L) resultou em menos fosforilado receptor possivelmente devido à degradação induzida por ligante. O anticorpo inibida PDGF-BB-induzida receptor para

níveis próximos de fundo (Fig. 14A, linha superior). Dados similares foram obtidos usando PDGF-AA para induzir a fosforilação receptor.

PDGFs traduzem sinais mitogênicos e exercem efeitos antiapoptóticos sobre proteínas espressionando receptor através de células efectoras abaixo. Consequentemente, o anticorpo monoclonal foi testado na sua capacidade de inibir a ativação de MAPKs p44/p42 e Akt (envolvidos no crescimento das células e precursores antiapoptóticos, respectivamente). As anticorpos anti-PDGFR α inibida fosforilação de ambos MAPKs e Akt em resposta a PDGF-BB (Fig. 2A) e PDGF-AA (não mostrada). Inibição de fosforilação de PDGFR α foi dependente da dose, com 50% inibição obtida em 0,25 nmol/L (Fig. 14B).

Atividade antimitogênica

O anticorpo monoclonal anti-PDGFR α foi testado pela sua capacidade de bloquear mitogênese induzida por PDGFAA de células PAE Ra. As células foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96-poços (1×10^4 células por poço) e crescidas rapidamente em 100 μ L de meio por bem. Os poços foram depois lavados com meio livre de soro e as células foram mantidas sem soro durante a noite com 75 μ L de meio livre de soro adicionados a cada poço. IgG foi adicionada (25 μ L/cavidade) e as placas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado PDGF-AA ou PDGF-BB (25 μ L/cavidade), e as placas foram incubadas durante 18 a 20 horas a 37°C. As placas foram incubadas por mais 4 horas após cada poço ter recebido 0,25 μ Ci [^{3} H] timidina (25 μ L/poço). Anticorpo, PDGF, e [^{3} H] timidina foram todos diluídos em meio livre de soro. As células foram então lavadas com PBS mais 1% albumina sérica bovina e separadas por tratamento com tripsina (100/xL/poço). As células foram recolhidas em um filtro e lavado thrice com dupla-água destilada usando uma célula harves MACH III (Tomtec, Inc., Hamden, CT). Após o processamento do filtro, a radioatividade do DNA incorporado foi determinada em um contador de cintilação (Wallac Microbeta, modelo 1450).

Quando MC-3 G3 foi adicionado a células PAE Ra em abstinência de soro, incorporação de timidina induzida por PDGF-AA foi especificamente inibida (Fig. 15), com uma EC₅₀ de 8,3 nmol/L. O anticorpo também inibiu o 3 nmol/L PDGF-BB-induzida mitogenesis do células PAE Ra com uma EC₅₀ de 1,25 nmol/L (dados não apresentados).

Inibição do crescimento de linhagens de células tumorais humanas expressando PDGFR α

Linhagens celulares tumorais humanas expressando PDGFR α foram testadas para determinar a influência dos anticorpo anti-PDGFR α humano sobre o crescimento em sistemas malignos, *in vitro* e *in vivo*. Duas dessas linhagens de células tumorais que expressam PDGFR α , conforme determinado pelo fluxo de citometria são SKLMS-1 (leiomiosarcoma) e U118 (glioblastoma). Estas linhagens celulares também respondem a ligantes em ensaios mitogênicos e formam tumores em camundongos. SKLMS-1 tem o potencial não apenas

para estimulação parácrina mas também autócrina. SKLMS-1 foi mostrado por expressar proteína PDGF-AA, quando cultivada em cultura usando uma técnica de imunoensaio de sanduíche de enzima quantitativa (R & D Systems).

Como se pode ver na figura. 16 A, IMC-3G3 inibiu a fosforilação de ambos Akt e MAPKs em resposta a PDGF-AA estimulação do SKLMS-1 células. A inibição da fosforilação de Akt foi 100% e a de MAPKs foi de cerca de 80%. O anticorpo é também um eficaz inibidor de fosforilação em células U118 (Fig. 16B). Ligand-induzida mitogenesis de células tumorais também foi bloqueado. Quando o anticorpo anti-PDGFR α foi adicionado a células U118 em abstinência de soro, a incorporação de timidina induzida por PDGF-AA foi especificamente inibida (Fig. 17A), com um EC50 de 3,4 nmol/L. O anticorpo também inibiu a resposta mitogênica induzida por PDGF-AA de SKLMS-1 células com uma EC50 de 5 nmol/L (Fig. 17B), bem como a resposta mitogênica induzida por PDGF-BB (Fig. 17C). Apenas a inibição parcial (40% a 66 nmol/L; Fig. 17D) de resposta mitogênica induzida por PDGF-BB foi observada para células U118. Isto é atribuído à expressão de ambos PDGFR α e PDGFR β nessas células (dados não apresentados).

Inibição de crescimento de tumor enxertado

IMC-3G3 foi testada *in vivo* em glioblastoma (U118) e leiomiosarcoma (SKLMS-1) por via subcutânea (sc) modelos enxertados em camundongos atímicos sem pêlo. Enxertos tumorais Sc foram estabelecidos através da injeção de 10×10^6 SKLMS-1 ou células mistas U118 em Matrigel (Collaborative Research Biochemicals, Bedford, MA) em camundongos fêmea atímicos sem pêlo (Crl: NU/NU-nuBR, Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Tumores foram deixados atingir uma volume tumoral médio ($\pi/6 \times$ maior comprimento $\times$ profundidade perpendicular²), de aproximadamente 400 mm³. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (N = 12) e tratado por Injeção ip duas vezes por semana durante o período de estudo. Os camundongos do Grupo 1 foram tratados com o veículo controle (0,9% NaCl, USP para Irrigação, B/Braun). Os camundongos dos Grupos 2 a 4 foram tratados com 6, 20, e 60 mg/kg de instantâneas anticorpos anti-PDGFR α . Os camundongos do Grupo 5 foram tratados com 60 mg/Kg IgG humana (Sigma). Os grupos tratados com 6, 20, ou 60 mg/kg anticorpos anti-PDGFR α ou IgG humana foram dadas 21,4, 71,4, e 214 mg/Kg de dose de carregamento, respectivamente. As doses de carregamento foram calculadas para atingir um uma concentração plasmática em estado estacionário da primeira dose (meia-vida de eliminação, 7 dias), utilizando um esquema posológico de duas vezes por semana. Tumorais volumes foram avaliadas duas vezes por semana e crescimento tumoral nos grupos de tratamento foi comparado com um ANOVA de medidas repetidas.

Conforme mostrado na figura. 18 A, IgG humana, não teve efeito sobre o crescimento de glioblastoma, em comparação com camundongos tratados com salina (P = 0,74), enquanto que o anticorpo anti-PDGFR α significativamente inibiu o crescimento tumoral em 6

($P = 0,06$), 20 ($P = 0,03$), e 60 ($P = 0,0004$) mg/Kg dose. No estudo final de U118, os valores % T/C [(média tumoral volumes para o grupo tratado com 3G3 na conclusão do estudo/volume tumoral médio no início do tratamento)/(tumoral volume médio de grupo tratado com controle em conclusão de estudo/volume tumoral médio no início do tratamento) $\times 100$] foram 67%, 63%, e 35% para grupos tratados com 3G3 doses de 6, 20, e 60 mg/kg, respectivamente. Além disso, a regressão tumoral foi observada em 4 de 12, 5 dos 11, e 10 de 12 animais no 6, 20, e 60 mg/kg grupos de tratamento. Não houve regressões em qualquer grupo controle.

A Fig. 18 B mostra que o crescimento de leiomiosarcoma também foi significativamente inibido pelo tratamento em 6 ($P=0,02$), 20 ($P=0,003$), e 60 ($P<0,0001$) mg/Kg. Os valores finais % de T/C foram 66%, 57%, e 31% para os grupos de tratamento 6, 20, e 60 mg/kg, respectivamente, sem regressões tumorais.

O exame histológico de enxertos no final do tratamento mostrou diferenças marcantes em tumores de animais tratados, em comparação com tumores de animais que receberam terapia controle. Os tumores resectados foram fixados em QDL fixador em 4 °C durante 24 horas. Depois de incorporação em parafina e seção em 4 μ m, seções fixas com formalina foram coradas com Mayer's H & E (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

No grupo U118 tratado com a dose mais alta (60 mg/Kg), menos células tumorais viáveis foram encontradas e lá foram substancialmente mais regiões com células esparsas, em comparação com o grupo controle com soro (Fig. 18C). Enxertos SKLMS-1 tratadas no dia 25 também mostraram uma redução na quantidade de células tumorais viáveis e embalagem celulares, em comparação com o grupo controle com soro (Fig. 18D).

Inibição *in vitro* de estimulação mediada por PDGFR α de uma linhagem de glioblastoma

O nível do receptor fosfotirosina em tumores U118 foi avaliado uma semana após o tratamento com anticorpo anti-PDGFR α ou IgGt humana. Camundongos com U118 tumores estabilizados (500 mm³) foram tratados com uma dose de carga de 214 mg/Kg seguida 72 horas mais tarde por uma dose de manutenção de 60 mg/Kg de anticorpos. Tumores foram colhidos dos camundongos uma semana (168 horas) após a primeira injeção de anticorpo (em um momento antes da regressão tumoral ser observada em média; ver Fig. 18A) e homogeneizadas em tampão de lise de ensaio de fosforilação (ver acima). Os lisados foram centrifugados duas vezes em 14000 RPM e a concentração de proteínas para o sobrenadante colhido foi determinada (ensaio de proteína Bio-Rad, Bio-Rad, Hercules, CA). Lisado (4 mg) de cada amostra foi imunoprecipitado utilizando anticorpos anti-PDGFR α . PDGFR α humanos imunoprecipitados foram então submetidos a imunoblot tanto com um anticorpo anti-PDGFR como anti-fosfotirosina. A Fig. 19 mostra que a administração de anticorpo anti-PDGFR α resultou na redução do nível de PDGFR α fosfotirosina relativa a um controle de

IgG humana nestes tumores.

Engenharia de Linhagem Celular

Primeiro, os genes codificando os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo anti-PDGFR α humano foram clonados e sequenciados. Uma série de iniciadores foi obtida de MEDAREX que anneals as seqüências de flanco 5' e 3' das seqüências de região variável de imunoglobulina humana em hibridomas derivados de MEDAREX. A região variável de cadeia pesada amplificada com par de iniciadores AB88 (frente) e AB90 (reverso) (Tabela 7). Os produtos de cadeia leve foram ampliados com pares de iniciadores contendo o iniciador de avanço AB 182 e o iniciador reverso AB 16 (Quadro 7). Os produtos de 0,4kb destas reações foram clonados no vetor ZeroBlunt (Invitrogen) para produzir AB88-1 (VH) e AB 182-3 (VK), e as inserções foram sequenciadas com T7 e M13R iniciadores universais.

Tabela 7 – Iniciadores para hibridomas MEDAREX

Oligo	Tamanho	Seqüência de DNA (5'-3')	SEQ ID NO
AB88	21	ATGAAACACCTGTGGTTCTTC	20
AB90	21	TGCCAGGGGGAAGACCGATGG	21
AB182	24	ATGGAA(G/A) CCCCAGCGCAGCTTCTC	22
AB16	20	CGGGAAGATGAAGACAGAI'G	23

A fim de gerar vetores plasmídeos para exprimir a anticorpos IgG1 completos, as regiões variáveis clonadas foram amplificadas com PCR e ligadas em duas etapas em genes de constante região contendo vetores de expressão. A amplificação com PCR primário de cadeia pesada utilizou 25 ng de plasmídeos AB88-1 como modelo para iniciadores IPHF5 (frente) e IPHR5 (verso). A amplificação com PCR secundário cadeia pesada utilizada 5 μ l de reação primária como modelo e os iniciadores OPSIF e IPHR5. A combinação dos dois em frente iniciadores adicionar um 57 básico par seqüência a extremidade 5' dos genes de imunoglobulina codificando uma seqüência sinal de gene de cadeia pesada de 19 aminoácidos de camundongo (MGWSCILFLVATATGVHS; SEQ ID NO: 24) para o processamento e secreção eficiente de imunoglobulina. Além disso, o balanço primário OPSIF acrescenta uma seqüência consensual "Kozak" (J Mol. Biol. 196:947) para eficiente início de tradução desses genes nas células de mamíferos e um local de restrição de endonuclease 5' HindIII para clonagem do produto amplificado no vetor de expressão adequado. O iniciador reverso de cadeia pesada contém um local NheI inframe para clonagem na região constante do vetor. PCR foi realizada em duas etapas utilizando o kit PCR Expand (Boehringer Mannheim Inc.), de acordo com especificações do fabricante utilizando sistema Expand Buffer # 3 em 50 μ l de reações com os seguintes condições de ciclo:

1 ciclo 94°, 2 minutos

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

Após duas rodadas de PCR, o produto foi purificado seguindo eletroforese em gel de agarose e clonado como um fragmento digerido HindIII-NheI em vetor pDFc (Fig. 8), que contém a região constante humana gama 1.

- 5 A amplificação DE PCR primário de cadeia leve utilizou 25 ng de plasmídeo pAB182-3 como iniciador modelo IPLF4 (frente) e IPLR2 (verso). A amplificação DE PCR secundário de cadeia leve utilizou 5 μ l de reação primária como modelo e os iniciadores OPSIF e IPLR2. Quanto à cadeia pesada, os dois iniciadores de avanço fornecem uma sequência de sinal de secreção. A cadeia leve reversa primária contém uma local BsiWI infra-
- 10 me para a clonagem na vetor de região constante kapa pLck (Fig. 8). As reações de PCR foram realizadas como a cadeia pesada acima. Após duas rodadas de PCR, o produto foi purificado seguindo eletroforese em gel de agarose e clonado em pLck, que contém a região de cadeia leve constante humana kapa.

Tabela 8 – Iniciadores para vetores de expressão de VH e VK

Oligo	Tamanho	Seqüência de DNA (5' – 3')	SEQ ID NO
OPSIF	53	GAGAAGCTTGCCGCCAC- CATGGGATGGTCATGTATCAT CCTTTTCTAGTAGC	25
IPHF5	58	TCCTTTTCTAGTAG- CAACTGCAACTGGAGTACATTCA CAGCTGCAGCTGCAGGACTC	26
IPHR5	37	CGCGCTAGCTGAGGAGACGGTGA CCAGGGTTCCCTGG	27
IPLF4	58	TCCTTTTCTAGTAG- CAACTGCAACTGGAGTACATTTCAG AAATTGTGTTGACACAGTC	28
IPLR2	37	GCGCGTACGTTI'GATTTCACCTT GGTCCCTTGGCCG	29

A fim de gerar um único vetor plasmídeo de estável transfecção, a fita de expressão

de cadeia pesada, contendo o promotor CMV, região de codificação de cadeia pesada, e elemento polyA foram clonados no vetor de cadeia leve como um fragmento NotI-Sa1I (Fig. 20).

Esta construção foi então utilizada para gerar uma linha de produção estável de linhagem de células de mieloma de células NSO. As células NSO foram transfectadas com a plasmídeo de expressão através eletroporação usando o BioRad Gene Pulser II. Antes da transfecção, o DNA do plasmídeo foi linearizado com PvuI, precipitado com etanol, e res-suspenso em uma concentração de 0,4 mg/mL (40 μ g em 100 μ l dH₂O). as células foram eletroporadas com a 40 μ g de DNA em um volume final de 800 μ L por um único pulso de 250 V, 400 μ Fd. As células eletroporadas estavam dispersas em alíquotas de 50 μ L em meio DMEM (JRH Biosciences Inc.), contendo soro de bezerro a 10% dialisados fetais (dFCS) (Hyclone, Lote #: AHA7675) e 2mM glutamina (Invitrogen/Life Technologies) em po-ços de aproximadamente dezoito placas de 96 poços a uma densidade de 5000-10000 célu-las por bem. A seleção de transfectantes positivo de glutamina sintetase (GS) foi iniciada 24 horas depois por meio da adição de DMEM livre de glutamina contendo dFCS 10% e com-plementadas com 1x GS suplemento (JRH Biosciences Inc.). As células foram cultivadas por 2-4 semanas a 37 °C, CO₂ 5% para permitir o crescimento e a expansão das colônias. Mais de 300 colônias foram selecionados através de um Fc anti-humana (gama) ELISA (deteção de peroxidase de rábano picante em A450nm). Clones expressando anticorpos (58%) foram ampliados e reanalisados para a produtividade durante 3-5 dias de cultivo. Para adaptar células em meio livre de soro, positivo as linhagens celulares foram expandidas por meio da adição de um volume igual de soro livre GS-OS cultivo médio em cada passagem. Positivos fortes, produzindo 25 μ g/mL ou mais em culturas de 24 poços sub-confluentes em 3 dias, foram expandidos para uma análise mais aprofundada para adaptação completa ao meio livre de soro.

Entende-se e espera-se que as variações nos princípios da invenção aqui divulga-dos possam ser feitas por alguém versado na técnica e pretende-se que essas modificações devam ser incluídas no âmbito de aplicação da presente invenção.

Lista de Seqüência

<110> ImClone Systems Incorporated, et al.

<120> Antagonistas dos Receptores para o Tratamento do Câncer Metastático Ósseo

<130> 11245/54076

<140> A ser determinado

<141> 2006-06-19

<150> 601691,920

<151> 2005-06-17

<160> 63

<170> Versão de Patente 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(15)

<400> 1

agt agt agt tac tac

15

Ser Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<400> 3

agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac aac ccg tcc ctc agg agt 48

Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 5

cag tcc acg tat tac tat ggt tgg ggg aat tat tat ggc tgg ttc gac 48

Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp

1 5 10 15

cgc 51

Arg

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp

1 5 10 15

Arg

<210> 7

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 7

cag ctg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tgc gag 48

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc aac agt agt 96

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser

20 25 30

agt tac tac tgg ggc tgg ctc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag 144

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

tgg att ggg agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192

Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

ctc agg agt cga ctc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

tcc ctg atg ctg agt tct gtg acc gcc gca gac acg get gta tat tac 288

Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

tgt gcg aga cag tcc acg tat tac tat ggt tgc ggg aat tat tat ggc 336

Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly

100 105 110

tgg ttc gac cgc tgg gac cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 381

Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 9

agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc 33

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 11

gat gca tcc aac agg gcc act 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(27)

<400> 13

cag cag cgt agc aac tgg cct ccg gcg

27

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala

1 5

<210> 15

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 15

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag get ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ccg 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> não-identificado

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> não-identificado

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> não-identificado

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 20

atgaaacacc tgtggttctt c

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 21

tgccaggggg aagacagatg g

21

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 22

atggaarccc cagcgagct tctc 24

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 23

cgggaagatg aagacagatg 20

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 25

<211> 53

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 25

gagaagcttg ccgccacat gggatggta tgtatcatcc ttttctagt agc 53

<210> 26

<211> 58

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 26

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaca gctgcagctg caggagtc 58

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> sintético

<400> 27

cgcgctagct gaggagacgg tgaccagggt tccctgg 37

<210> 28

<211> 58

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 28

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaga aattgtgtg acacagtc 58

<210> 29

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 29

gcgcgtagct ttgattcca ccttggtccc ttggcgg 37

<210> 30

<211> 1431

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1431)

<400> 30

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15
 gta cat tca cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96
 Val His Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 aac agt agt agt tac tac tgg ggc tgg ctc cgc cag tcc cca ggg aag 192
 Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys
 50 55 60
 ggg ctg gag tgg att ggg agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac 240
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 aac ccg tcc ctc agg agt cga ctc acc ata tcc gta gac acg tcc aag 288
 Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 aac cag ttc tcc ctg atg ctg agt tct gtg acc gcc gca gac acg get 336
 Asn Gln Phe Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 gta tat tac tgt gcg aga cag tcc acg tat tac tat ggt tcg ggg aat 384
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn
 115 120 125
 tat tat ggc tgg ttc gac cgc tgg gac cag gga acc ctg gtc acc gtc 432
 Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140
 tcc tca get agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc 480
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag 528
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175
 gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg 576
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190
 acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg get gtc cta cag tcc tca gga ctc 624
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205

tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc 672
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220
 cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg 720
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240
 gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca 768
 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 245 250 255
 ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc 816
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 260 265 270
 ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc 864
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 275 280 285
 aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc 912
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 290 295 300
 aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg 960
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc 1008
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335
 gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc 1056
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc 1104
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg 1152
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc 1200
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 385 390 395 400
 ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg 1248

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

405 410 415

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc 1296

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

420 425 430

ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 1344

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

435 440 445

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag get ctg cac aac cac 1392

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

450 455 460

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga 1431

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

465 470 475

<210> 31

<211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr

65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn

115 120 125

Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 245 250 255
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 260 265 270
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 290 295 300
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 385 390 395 400
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 405 410 415
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

435 440 445
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 450 455 460
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475
 <210> 32
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)
 <400> 32
 atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 gta cat tca gaa att. gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg 96
 Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
 20 25 30
 tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt 144
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 35 40 45
 agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag get ccc agg 192
 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60
 ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg 240
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc 288
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95
 cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac 336
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn
 100 105 110
 tgg cct ccg gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt acg 384
 Trp Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

gtg get gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg 432
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc 480
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt 528
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac 576
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac 624
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc 672
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 702
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 33
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
 20 25 30
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

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

225 230

<210> 34

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(15)

<400> 34

agc tat get atc agc

15

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 36

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 36

ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc cag 48

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

ggc 51

Gly

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213>• Homo sapiens

<400> 37

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

<400> 38

gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac tac tac 48

Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

tac tac atg gac gtc 63

Tyr Tyr Met Asp Val

20

<210> 39

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Met Asp Val

20

<210> 40

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(390)

<400> 40

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg get gag gtg aag aag cct ggg tcc 48

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag get tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

get atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc 192

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 240

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac 336

Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr

100 105 110

tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc 384

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

tca agc 390

Ser Ser

130

<210> 41

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr

100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 42

<211> 1440

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1440)

<400> 42

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 gta cat tca gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg get gag gtg aag aag 96
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag get tct gga ggc acc ttc 144
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
 35 40 45
 agc agc tat get atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg atg gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca 240
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc 288
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 tat tac tgt gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln
 115 120 125
 gac cac tac tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg 432
 Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
 130 135 140
 gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg 480
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 145 150 155 160
 gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc 528
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 165 170 175
 ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca 576
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 180 185 190
 ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg get gtc cta cag tcc 624
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

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

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1248
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415
 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1296
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430
 gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag age agg 1344
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445
 tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag get ctg 1392
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 450 455 460
 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1440
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475
 <210> 43
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln
 115 120 125
 Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr

130 135 140
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 145 150 155 160
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 165 170 175
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 180 185 190
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 195 200 205
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 210 215 220
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 225 230 235 240
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 245 250 255
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 260 265 270
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 275 280 285
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 290 295 300
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 325 330 335
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 340 345 350
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 355 360 365
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

435 440 445

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

450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470 475

<210> 44

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 44

caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca acc 33

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 46

ggt gaa aat aag cgg ccc tca 21

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 48

aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat ctg gtg 33

Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val

1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val

1 5 10

<210> 50

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 50

tct tct gag ctg act cag gac cct get gtg tct gtg gcc ttg gga cag 48

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca 96

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

20

25

30

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

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

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

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

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

<210> 51

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

<210> 52

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(702)

<400> 52

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

165 170 175
 aag gcg gga,gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag 576
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 180 185 190
 tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc 624
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 195 200 205
 cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 672
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 210 215 220
 aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct tga 702
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 225 230
 <210> 53
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 20 25 30
 Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu
 50 55 60
 Val Ile Tyr Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 85 90 95
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gln His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 115 120 125
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 130 135 140
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

145 150 155 160
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 165 170 175
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 195 200 205
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 210 215 220
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser

225 230

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 54

caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc 33

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 56

ggt aaa aac aac cgg ccc tca
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

21

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 58

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 58

aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt ctg ata

33

Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile

1 5 10

<210> 60

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 60

tct tct gag ctg act cag gac cct get gtg tct gtg gcc ttg gga cag

48

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca 96
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat 144
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc 192
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 agc tca gga aac aca get tcc ttg acc atc act ggg get cag gcg gaa 240
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 gat gag get gac tat tac tgt aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg
 85 90 95
 ctg ata ttt ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctc agt 327
 Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
 100 105
 <210> 61
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg
 85 90 95

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

100

105

<210> 62

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(702)

<400> 62

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca.act gga 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1

5

10

15

gta cat tca tct tct gag ctg act cag gac cct get gtg tct gtg gcc 98

Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala

20

25

30

ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc 144

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser

35

40

45

tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt 192

Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu

50

55

60

gtc atc tat ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc 240

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe

65

70

75

80

tct ggc tcc agc tca gga aac aca get tcc ttg acc atc act ggg get 288

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala

85

90

95

cag gcg gaa gat gag get gac tat tac tgt aac tcc cgg gac aac agt 336

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser

100

105

110

gat aac cgt ctg ata ttt ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctc agt 384

Asp Asn Arg Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser

115

120

125

cag ccc aag get gcc ccc tgc gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag 432

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

130

135

140

gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc 480
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 145 150 155 160
 tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc gtc 528
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 165 170 175
 aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag 576
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 180 185 190
 tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc 624
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 195 200 205
 cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 672
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 210 215 220
 aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct tga 702
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 225 230
 <210> 63
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 20 25 30
 Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
 50 55 60
 Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 85 90 95
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser
 100 105 110

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

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de anticorpo humano isolado específico para PDGFR α , **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma ou mais regiões de determinação de complementaridade selecionada a partir do grupo consistindo em de SEQ ID nº:2 em CDRH1; SEQ ID nº:4 em CDRH2; SEQ ID nº:6 em CDRH3; SEQ ID nº:10 em CDRL1; SEQ ID nº:12 em CDRL2; e SEQ ID nº:14 em CDRL3.
2. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº:2 em CDRH1; SEQ ID nº:4 em CDRH2; e SEQ ID nº:6 em CDRH3.
3. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº: 8.
4. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº: 10 em CDRL1; SEQ ID nº:12 em CDRL2; e SEQ ID nº:14 em CDRL3.
5. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº: 16.
6. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº:2 em CDRH1; SEQ ID nº:4 em CDRH2; SEQ ID nº:6 em CDRH3; SEQ ID nº:10 em CDRL1; SEQ ID nº:12 em CDRL2; e SEQ ID nº:14 em CDRL3.
7. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº:8 e SEQ ID nº: 16.
8. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que liga seletivamente um PDGFR α .
9. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que inibe a ligação de PDGFR α a um ligante de PDGFR α .
10. Anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que neutraliza PDGFR α .
11. Fragmento de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo consistindo em um anticorpo de cadeia única, Fab, Fv de cadeia única, um diacorpo, e um triacorpo.
12. Conjugado do anticorpo ou fragmento de anticorpo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que está de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7.
13. Conjugado, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um agente anti-neoplásico, uma fração alvo ou uma fração repórter.
14. Polinucleotídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de codifica um anticorpo

ou fragmento de anticorpo e compreende uma ou mais seqüências de nucleotídeos selecionadas a partir do grupo consistindo em SEQ ID nº: 1 em CDRH1; SEQ ID nº:3 em CDRH2; SEQ ID nº:5 em CDRH3; SEQ ID nº:9 em CDRL1; SEQ ID nº:11 em CDRL2; e SEQ ID nº:13 em CDRL3.

5 15. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº:7.

 16. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender SEQ ID nº:15.

10 17. Vetor de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender o polinucleotídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 14 a 16.

 18. Célula hospedeira recombinante, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender o vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 17.

15 19. Célula hospedeira recombinante, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir um polipeptídeo compreendendo SEQ ID nº:8 e um polipeptídeo compreendendo SEQ ID nº: 16.

 20. Célula hospedeira recombinante, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir um polipeptídeo compreendendo SEQ ID nº:8 e SEQ ID nº: 16.

20 21. Uso do anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para neutralizar a ativação de PDGFR α em um mamífero.

 22. Uso do anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para inibir o crescimento de um tumor em um mamífero.

25 23. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor expressa PDGFR α .

 24. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor super-expressa PDGFR α .

30 25. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor primário.

 26. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor metastático.

 27. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor refratário.

35 28. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor vascularizado.

 29. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o

tumor é selecionado a partir do grupo consistindo em um tumor de ovário, um tumor de mama, um tumor de pulmão, um tumor hepatocelular, um tumor estromal gastrointestinal, um melanoma, um carcinoma celular renal, um tumor próstata, e um sarcoma de tecido macio.

5 30. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo é administrado em associação com um agente anti-neoplásico.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o agente neoplásico é um agente quimioterápico.

10 32. Uso, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o agente neoplásico é doxorubicina.

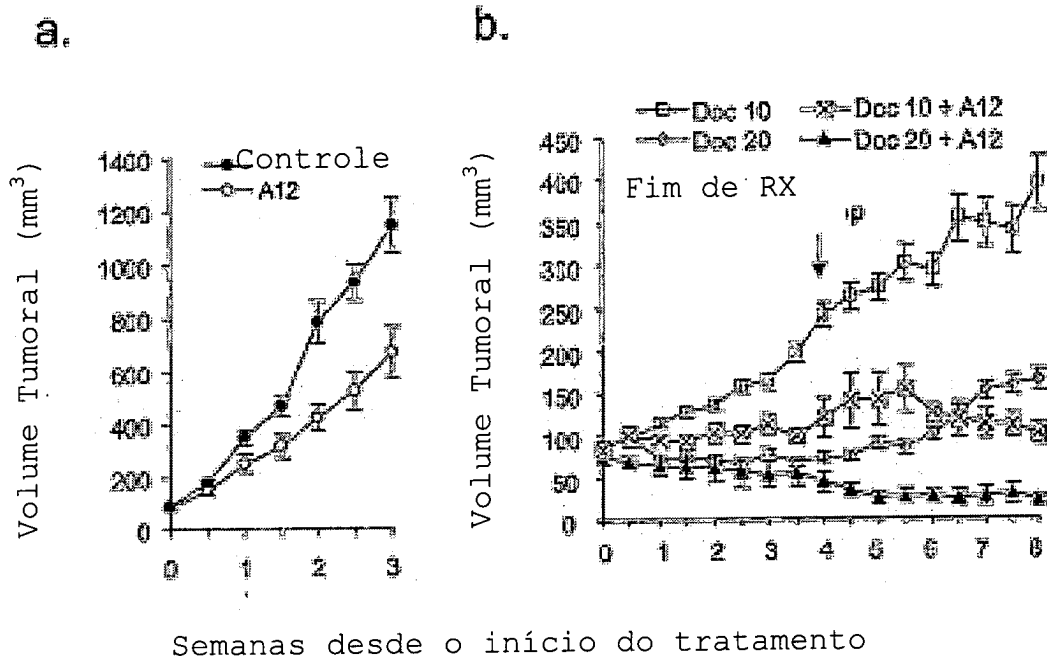
33. Uso, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o agente neoplásico é radiação.

15 34. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo é administrado com um secundo antagonista de PDGFR α .

35. Uso, de acordo com a reivindicação 34, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista de PDGFR α é um antagonista intracelular de PDGFR α .

20 36. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR).

37. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-IR).



c.

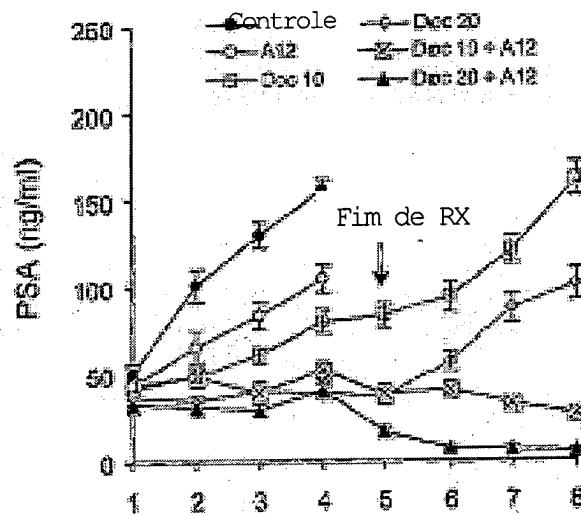


Fig. 1

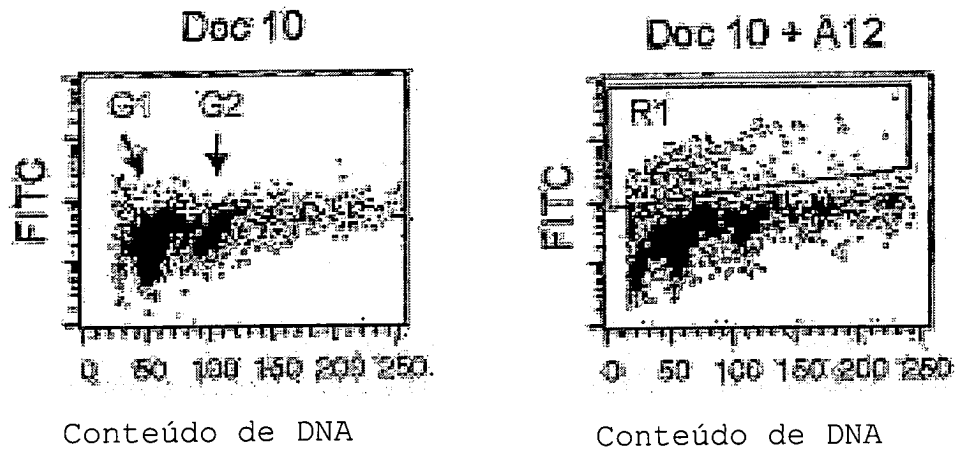


Fig. 2

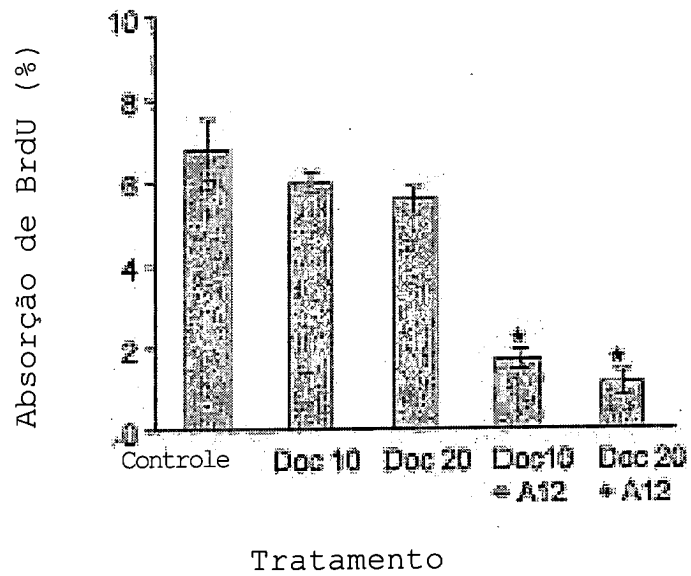


Fig. 3

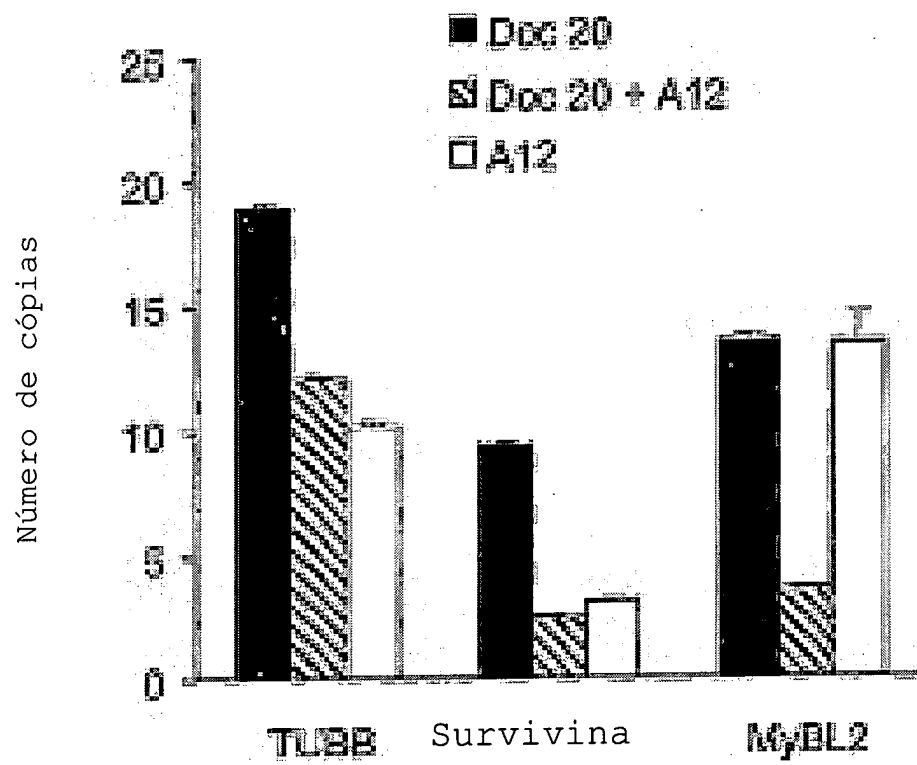
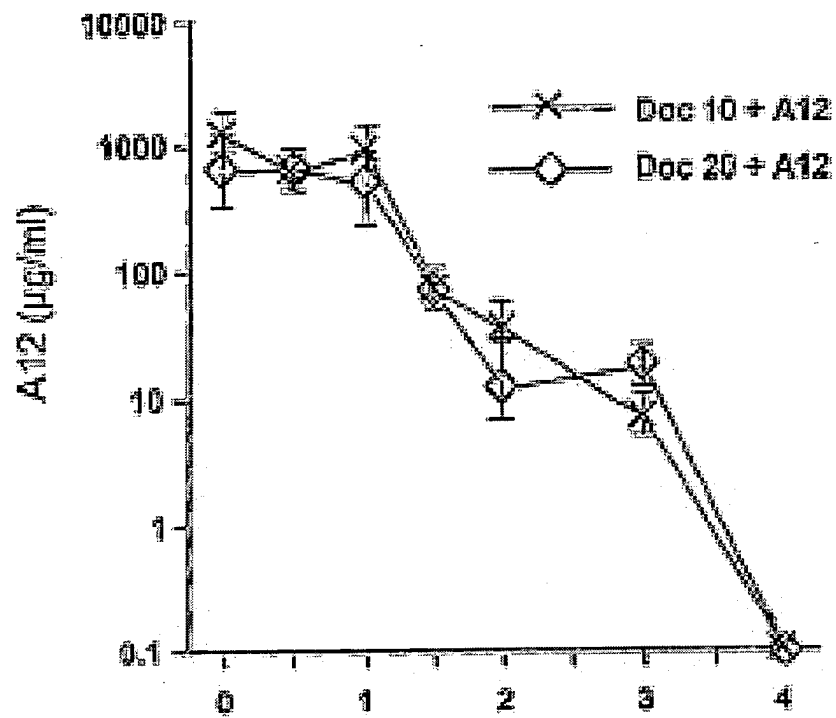


Fig. 4



Semanas após o fim do tratamento

Fig. 5

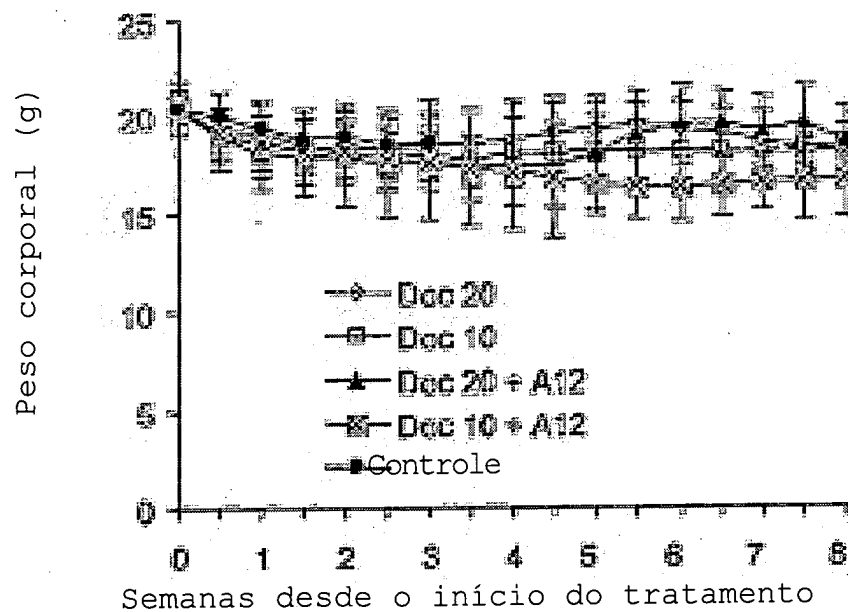


Fig. 6

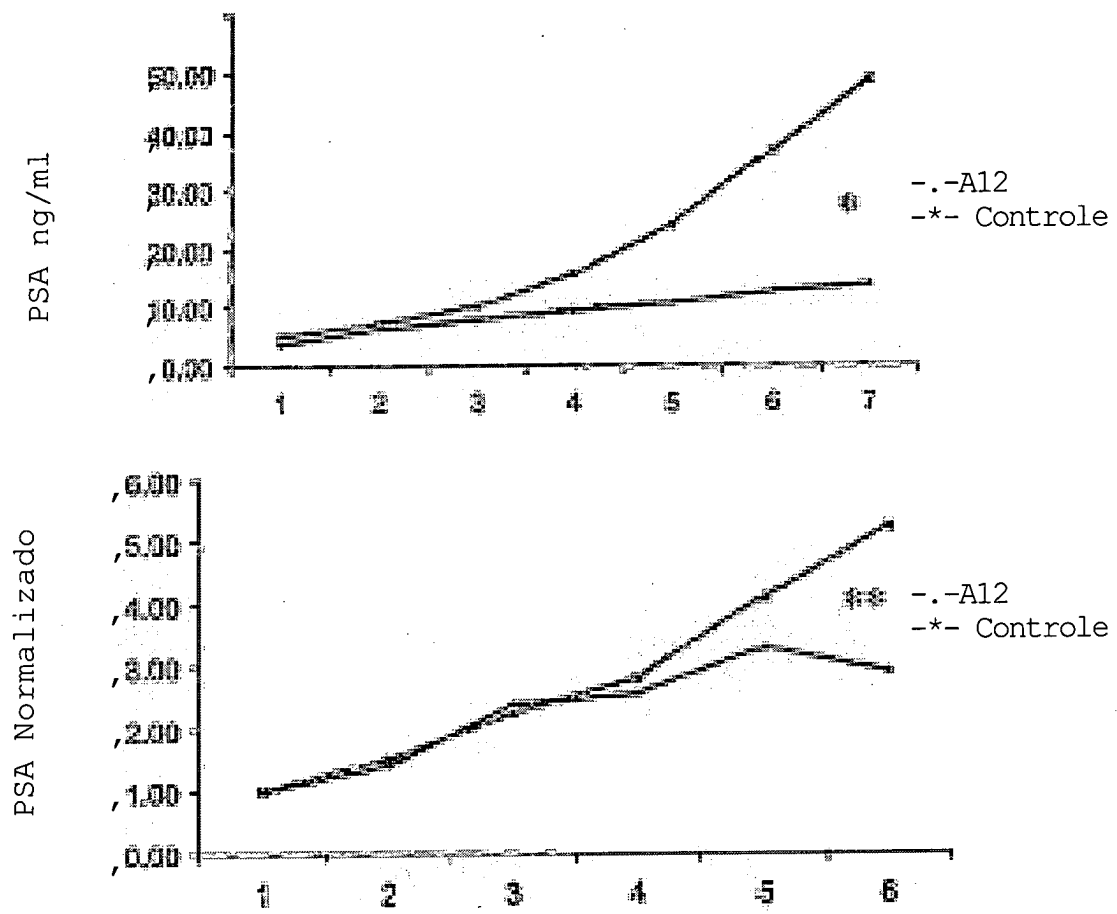
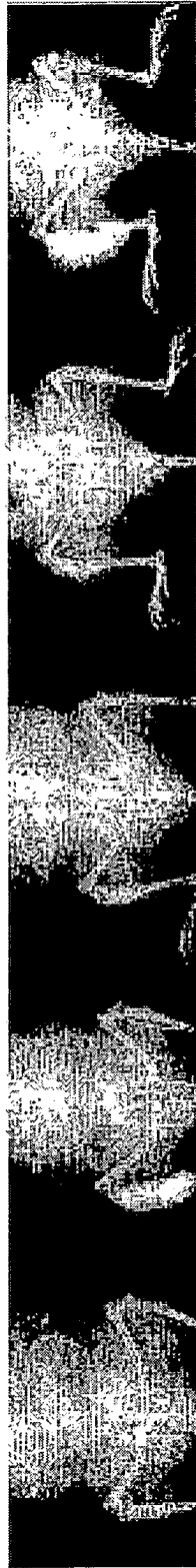
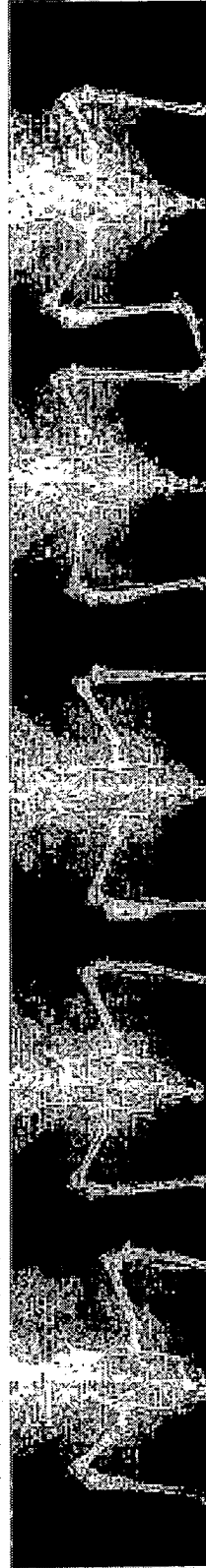


Fig. 7



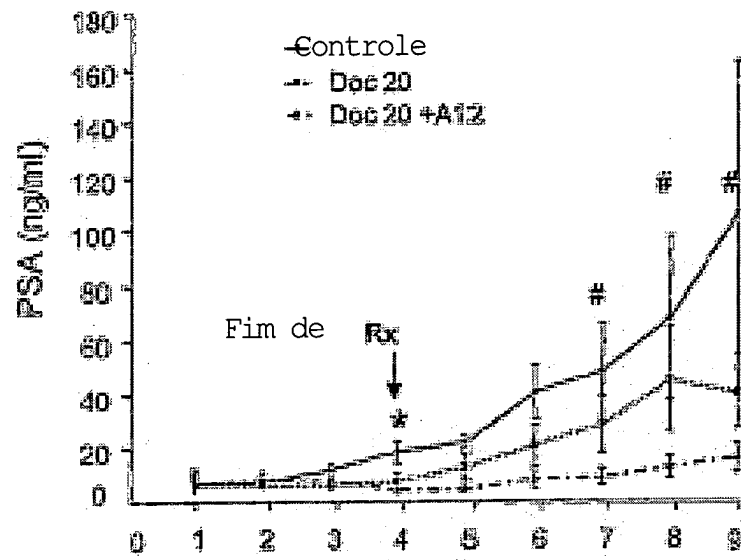
Controle



A12

Fig. 8

a.



Semanas após o início do tratamento

b.

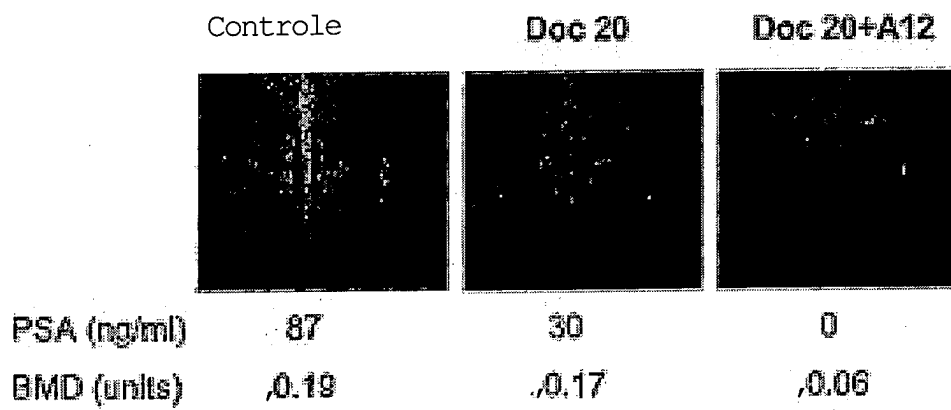


Fig. 9

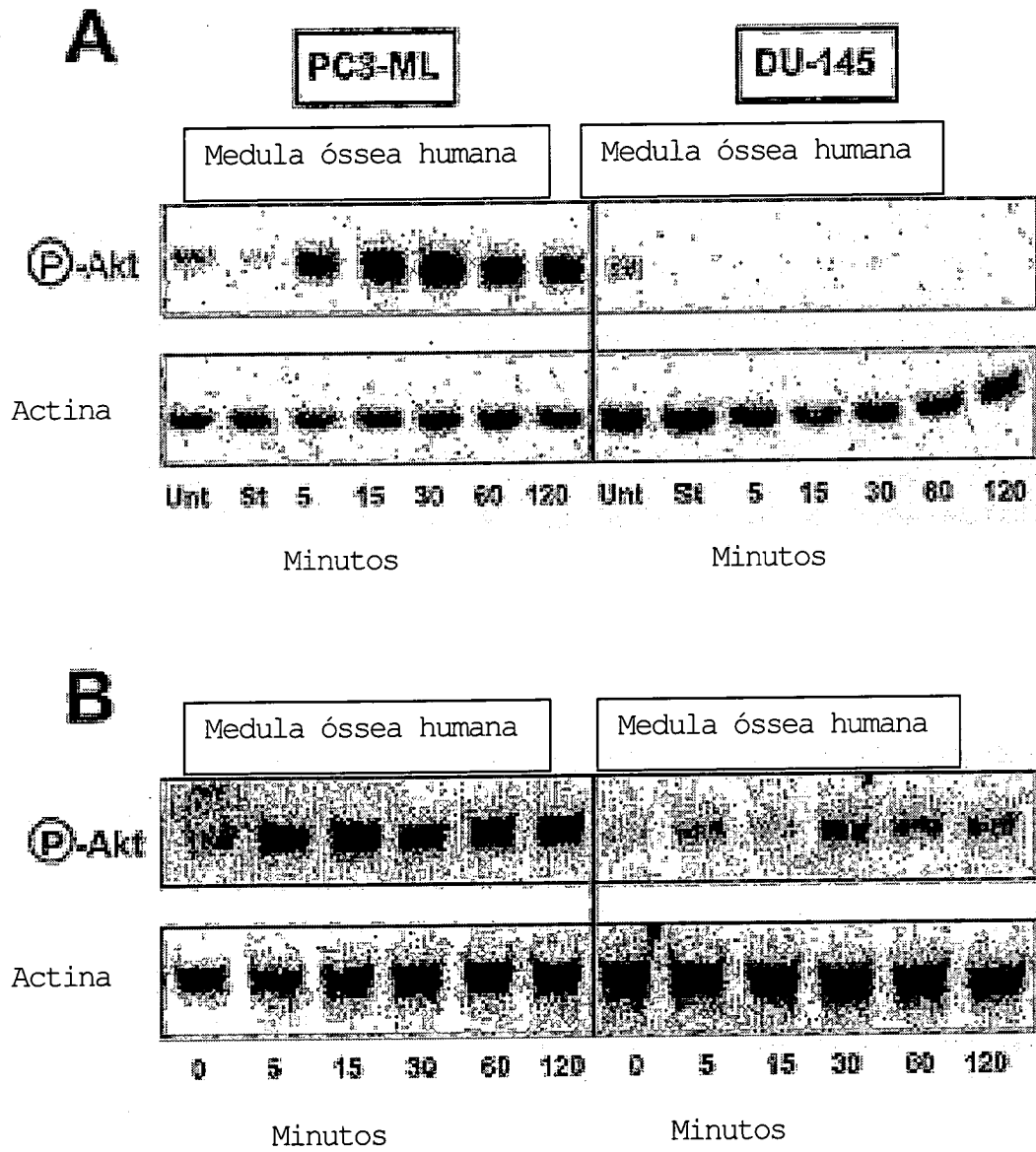


Fig. 10

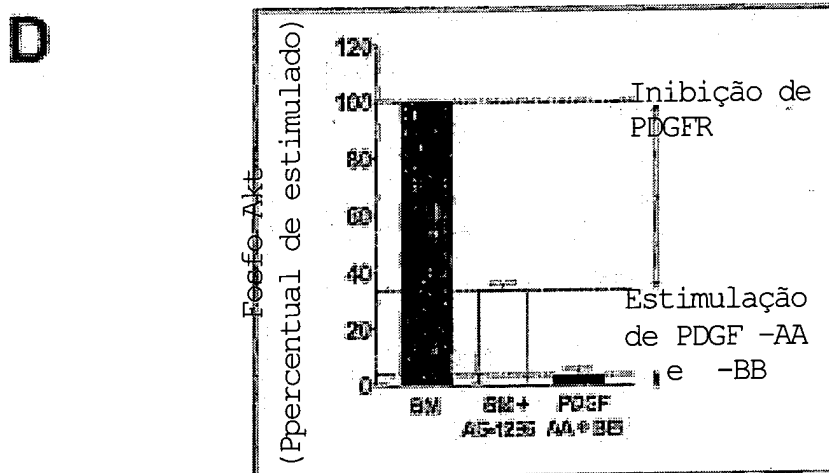
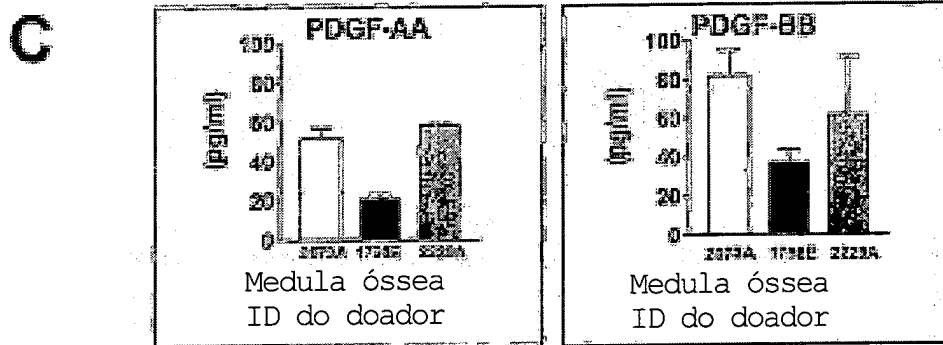
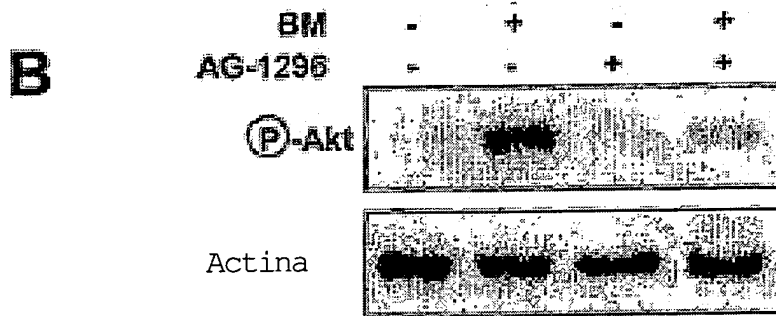
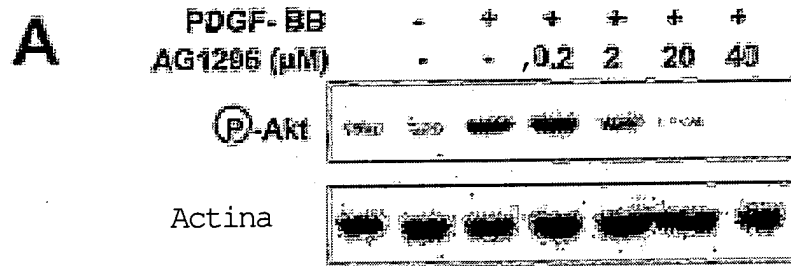


Fig. 11

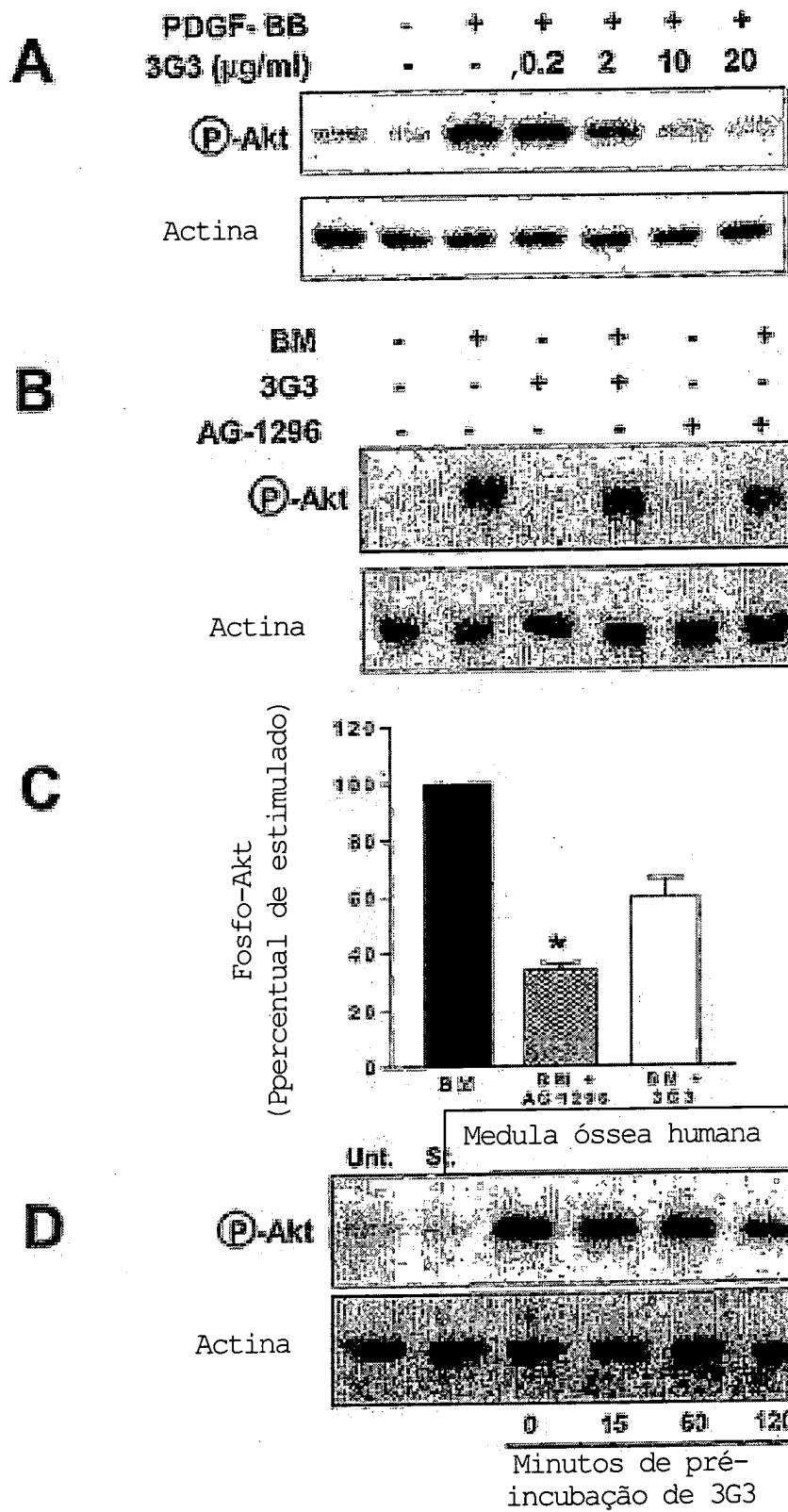


Fig. 12

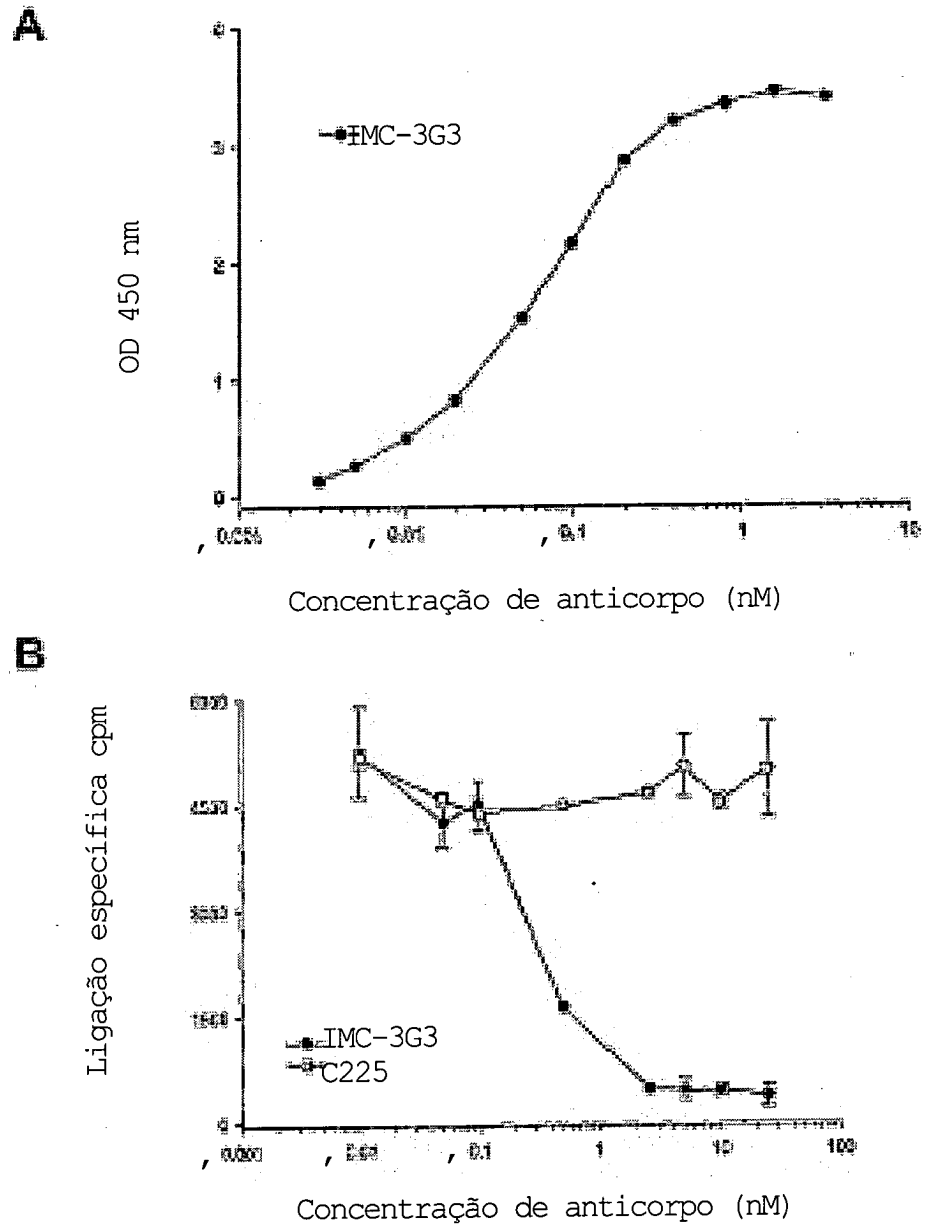


Fig. 13

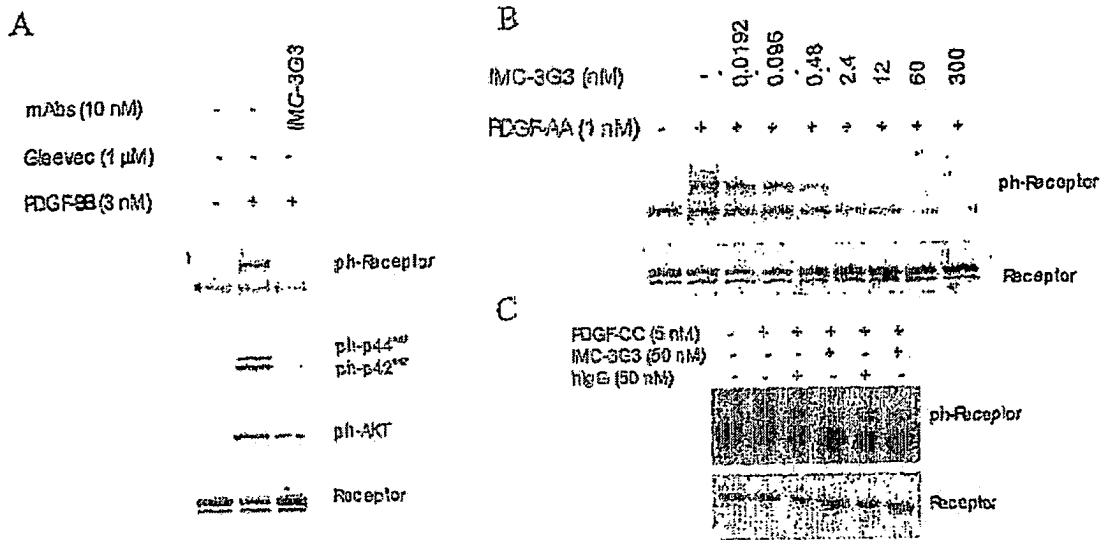


Fig. 14

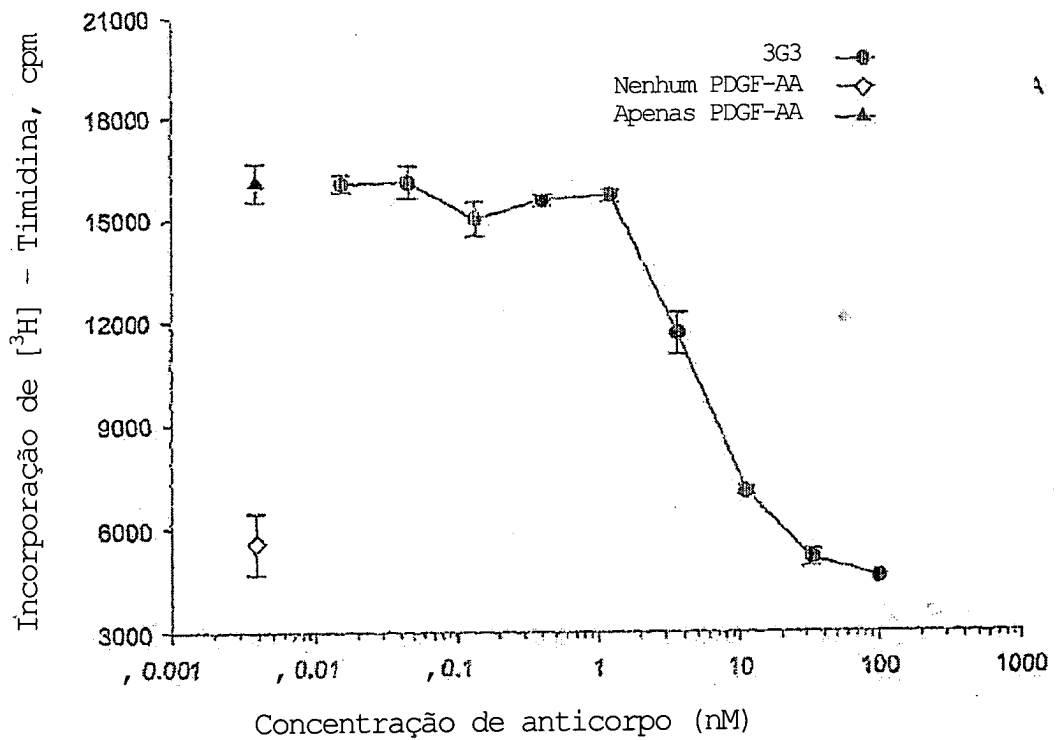
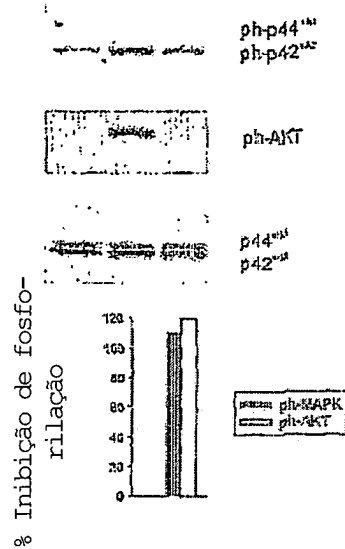


Fig. 15

A.

IMC-3G3 (5 nM) - - +
PDGF-AA (5 nM) - + +



B.

IMC-3G3 (nM) - - 10 50
PDGF-AA (1 nM) - + + +

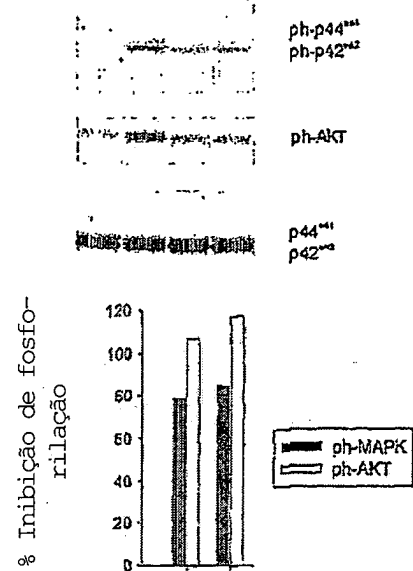


Fig. 16

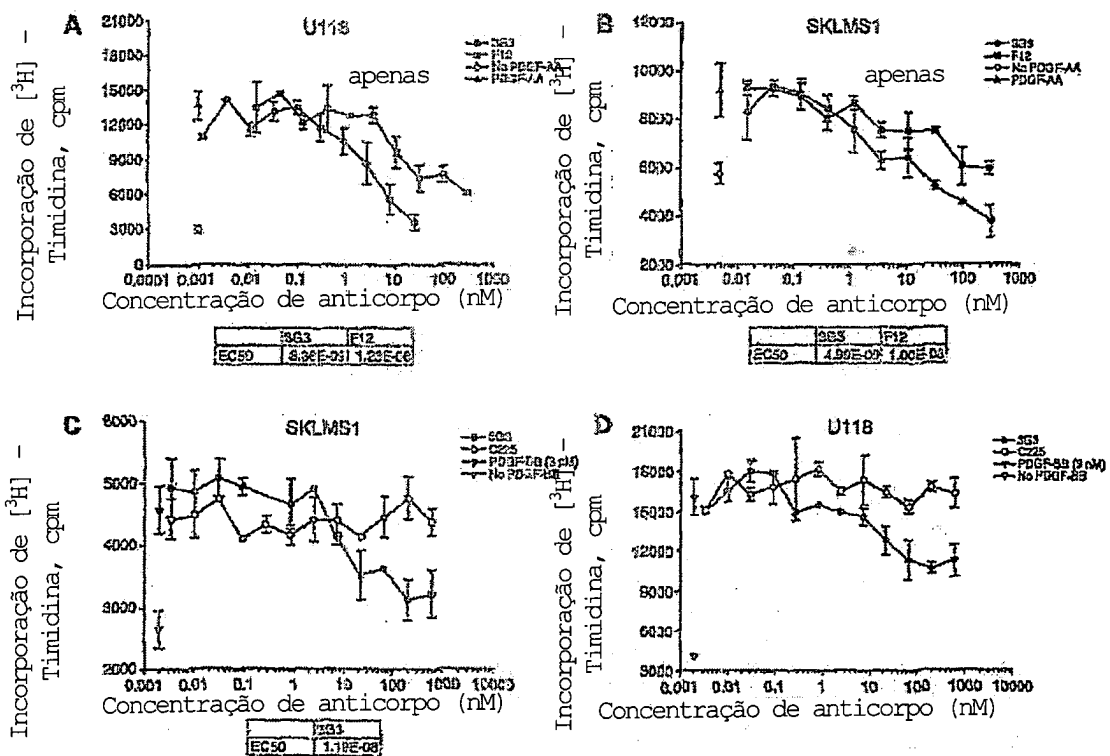


Fig. 17

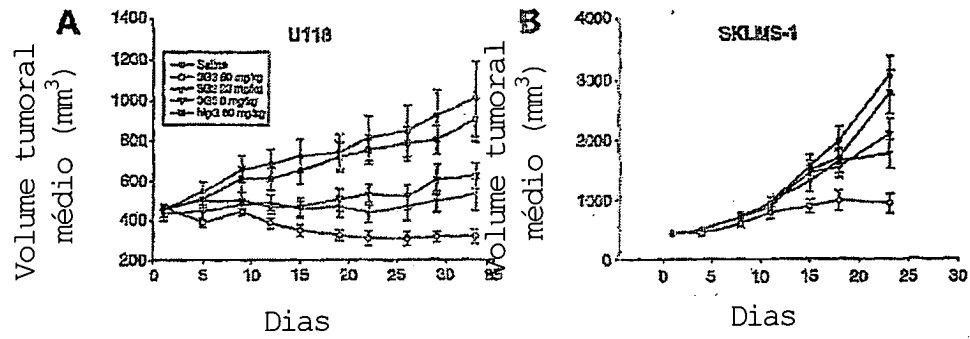


Fig. 18

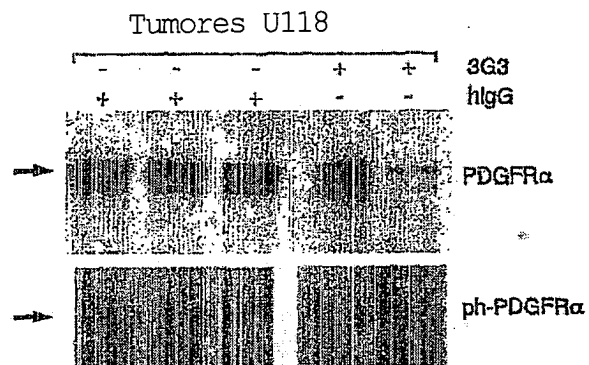


Fig.19

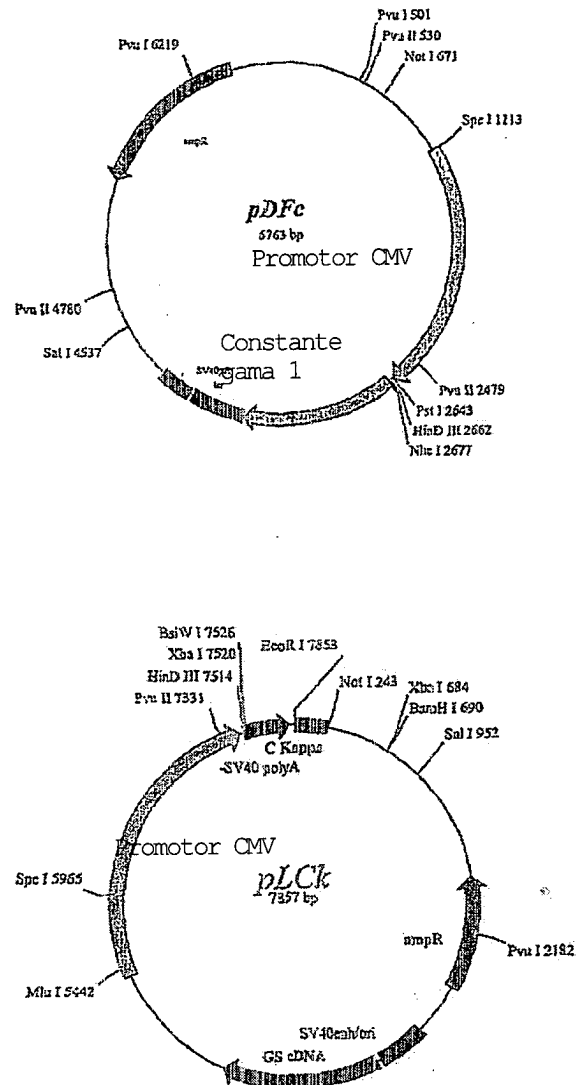


Fig.20

RESUMO

"ANTICORPOS DE PDGFR α "

- 5 A invenção fornece usos de um antagonista IGF-IR e/ou PDGFR α na fabricação de medicamentos para tratar câncer ósseo, em particular o câncer ósseo metastático. A invenção fornece também anticorpos que se ligam aos PDGFR α humanos e neutralizam a ativação dos receptores. A invenção ainda fornece um método para neutralizar a ativação de PDGFR α , e um uso do anticorpo isoladamente ou em combinação com outros agentes na fabricação de medicamentos para tratar uma doença neoplásica.